UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1947-1948 — N° 64

LES RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS

ÉTUDE THÉORIQUE. RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

(Professeur agrégé F. TAYEAU)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 27 Février 1948

PAR

Eugène NEUZIL

LICENCIÉ ÈS SCIENCES
ANCIEN EXTERNE DES HÔPITAUX (MÉDAILLE D'ARGENT)
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE COLONIALE
LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
ANCIEN PRÉPARATEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
ANCIEN STAGIAIRE DE RECHERCHES
AU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ASSISTANT A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Né à Paris (Seine), le 9 Juin 1921

Examinateurs de la Thèse

MM. CHELLE, professeur ..... *Président*
DUBREUIL, professeur .....
AUBERTIN, professeur..... *Juges*
TAYEAU, agrégé.....

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1948

NEUZIL (Eugène)

Les réactions de précipitation antigène-anticorps. Etude théorique. Recherches expérimentales. Travail du Laboratoire de chimie biologique et médicale (Professeur agrégé F. TAYEAU). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1948. In-8°, XII-300 p., fig.

(Thèse Médec. Bordeaux. 1947-1948. N° 64.)

NEUZIL (Eugène)

Les réactions de précipitation antigène-anticorps. Etude théorique. Recherches expérimentales. Travail du Laboratoire de chimie biologique et médicale (Professeur agrégé F. TAYEAU). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1948. In-8°, XII-300 p., fig.

(Thèse Médec. Bordeaux. 1947-1948. N° 64.)

NEUZIL (Eugène)

Les réactions de précipitation antigène-anticorps. Etude théorique. Recherches expérimentales. Travail du Laboratoire de chimie biologique et médicale (Professeur agrégé F. TAYEAU). lard, 1948. In-8°, XII-300 p., fig. — Bordeaux, impr. E. Drouil-

(Thèse Médec. Bordeaux. 1947-1948. N° 64.)

NEUZIL (Eugène)

Les réactions de précipitation antigène-anticorps. Etude théorique. Recherches expérimentales. Travail du Laboratoire de chimie biologique et médicale (Professeur agrégé F. TAYEAU). — Bordeaux, impr. E. Drouillard, 1948. In-8°, XII-300 p., fig.

(Thèse Médec. Bordeaux. 1947-1948. N° 64.)

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1947-1948 – N° 64

LES RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS

ÉTUDE THÉORIQUE. RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

(Professeur agrégé F. TAYEAU)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 27 Février 1948

PAR

Eugène NEUZIL

LICENCIÉ ÈS SCIENCES
ANCIEN EXTERNE DES HÔPITAUX (MÉDAILLE D'ARGENT)
DIPLÔMÉ DE MÉDECINE COLONIALE
LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
ANCIEN PRÉPARATEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
ANCIEN STAGIAIRE DE RECHERCHES
AU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ASSISTANT A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Né à Paris (Seine), le 9 Juin 1921

Examinateurs de la Thèse

MM. CHELLE, professeur	*Président*	
DUBREUIL, professeur	*Juges*	
AUBERTIN, professeur.....	*Juges*	
TAYEAU, agrégé.....	*Juges*	

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE

1948

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. DUPÉRIÉ — ASSESSEUR : M. CHELLE

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DENIGÈS, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PÉRY, LABAT.

PROFESSEURS :

	MM.
Clinique médicale	DUPÉRIÉ / CREYX
Clinique chirurgicale et gynécologique	CHARRIER
Clinique chirurgicale	PAPIN
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY
Anatomie	VILLEMIN
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL
Hygiène	PIÉCHAUD
Médecine légale et déontologie	DERVILLÉE
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	CHELLE
Botanique et matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants	FONTAN

	MM.
Zoologie et parasitologie	SIGALAS
Médecine expérimentale	AUBERTIN
Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LOUBAT
Clinique des maladies infectieuses	DAMADE
Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ

M. PERRENS (Maladies mentales).

MAITRE DE CONFÉRENCES :

Physique pharmaceutique ..... BLANQUET.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Anatomie	DUFOUR
Physiologie	N. .
Médecine générale	N... / N... / N... / BROUSTET / N... / SARIC / DUBARRY / J. TRAISSAC
Chirurgie générale	N... / MASSÉ / N... / MAGENDIE

	MM.
Chirurgie générale	POUYANNE / LAUMONIER
Obstétrique	N... / MAHON
Ophtalmologie	BESSIÈRE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Chimie médicale	TAYEAU
Physique médicale	N...
Chimie générale pharmaceut. et toxicologie.	N...
Histoire naturelle pharmaceutique	GIRARD
Pharmacie	MESNARD / N...
Histoire naturelle médicale et parasitologie.	N...
Histologie	MAYER.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	MASSÉ
Accouchements	N...
Puériculture	PÉRY
Urologie	N...
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI
Ophtalmologie	N...
Anatomie	RIGAUD
Chimie minérale	N...

	MM.
Botanique	GIRARD
Cryptogamie	GIRARD
Pharmacie galénique	MESNARD
Bactériologie	MOUREAU
Physiologie	Mme ROUGIER
Chimie biologique	N...
Parasitologie et biologie appliquées	PAUTRIZEL
Electro-radiologie	CAILLON

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

RIJKS UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MON PÈRE

A MA MÈRE

Faible témoignage de ma grande affection et de ma profonde reconnaissance.

A MA GRAND'MÈRE

A MA FIANCÉE

A MA FAMILLE

A LA MÉMOIRE DE MES AMIS
PIERRE BOUVILLE
JEANNE PÉGOURIÉ-COLOBERT

A MES CAMARADES D'EXTERNAT

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE
DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

A MES CAMARADES DU 18e ESCADRON DU TRAIN

A MES AMIS

AU CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Dont la générosité et l'aide matérielle nous ont été précieuses.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR POLONOVSKI

PROFESSEUR DE CHIMIE MÉDICALE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Mon cher Maître,

Vous nous avez accueilli dans votre Laboratoire; nous avons le privilège de bénéficier ainsi de vos précieux conseils et de suivre votre remarquable enseignement.

Vous avez bien voulu nous intégrer dans le cadre de votre Service et nous associer à vos travaux.

Veuillez trouver ici l'expression de notre très profonde et très respectueuse reconnaissance.

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE BORDEAUX

A NOS MAITRES DES HOPITAUX

A NOS MAITRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE PROFESSEUR DEVAUX

PROFESSEUR HONORAIRE A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Avec nos remerciements pour le bienveillant intérêt qu'il nous a toujours témoigné.
Hommage de profonde admiration.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. AURIAC

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LACOSTE

In memoriam

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ R. SARIC

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. DELMAS-MARSALET

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. DAMADE

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MAURIAC

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. DUPÉRIÉ

A qui je dois ma formation clinique.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ G. MAYER

Avec nos remerciements pour sa précieuse collaboration.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR SIGALAS

PROFESSEUR DE ZOOLOGIE ET PARASITOLOGIE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Hommage respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MACHEBŒUF

CHEF DE SERVICE A L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

MEMBRE DU COMITÉ CONSULTATIF D'HYGIÈNE DE FRANCE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE 1939-1945

MÉDAILLE DE LA RÉSISTANCE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Nous avons eu le plaisir de suivre vos cours pendant deux années, puis de travailler dans une atmosphère toujours empreinte de votre présence.

Vos travaux immunochimiques nous ont guidé au cours de ce travail.

Hommage respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ F. TAYEAU

CHARGÉ DE LA CHAIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOCTEUR ÈS SCIENCES

Dès notre premier stage hospitalier, une sympathie réciproque nous a rapprochés.

Au cours des visites que nous lui avons rendues au Laboratoire, nous avons été gagné par l'ambiance de la recherche, et nous avons bientôt désiré y participer nous-même.

Nos vœux ont été comblés quand il a bien voulu nous faire travailler à ses côtés.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR E. AUBERTIN

PROFESSEUR DE MÉDECINE EXPÉRIMENTALE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

MÉDECIN DES HÔPITAUX

CROIX DE GUERRE

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

CHEVALIER DE L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

Qui fut notre Maître à la Faculté et à l'Hôpital.
Hommage respectueusement reconnaissant.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. DUBREUIL

PROFESSEUR D'ANATOMIE GÉNÉRALE ET HISTOLOGIE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Nous avons conservé le meilleur souvenir de notre séjour dans votre Laboratoire, et nous sommes très honoré de vous compter aujourd'hui parmi nos Juges.
Témoignage de profonde gratitude.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHELLE

PROFESSEUR DE CHIMIE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

CHEVALIER DE L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

La sympathie que vous ne cessez de nous témoigner nous est infiniment précieuse.

Aujourd'hui encore, vous nous faites l'honneur de présider notre Jury de thèse.

Veuillez agréer, avec nos plus vifs remerciements, l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

LES RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION
ANTIGÈNE-ANTICORPS
ÉTUDES THÉORIQUES
RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

INTRODUCTION

Le 28 septembre 1895, Louis Pasteur s'éteignait à Garches. Le grand savant avait non seulement réalisé des expériences immortelles, découvert le rôle capital des microbes dans la genèse des maladies contagieuses, montré comment prévenir et enrayer certaines d'entre elles, mais il avait surtout créé une nouvelle science, ouvert un immense champ de recherches à ses successeurs. Méthode et Sciences Pastoriennes devaient connaître le prodigieux essor qui a conduit à la découverte des virus-protéines, des vaccins chimiques synthétiques et de tous les antibiotiques actuels.

En 1895, les élèves de Pasteur étaient déjà innombrables. Certains d'entre eux, à la suite des remarquables travaux de Metchnikoff sur la phagocytose [606], s'attachaient au côté plus spécialement cytologique de la défense des organismes. Mais d'autres jetaient déjà les bases d'une immunité purement humorale. Fodor [265], Nissen [656], Grohmann [331], Nuttal [661] puis Buchner [109] signalèrent les premiers l'existence d'un pouvoir bactéricide dans le sérum sanguin exempt de cellules.

Il y a exactement cinquante ans, en 1897, un chercheur autrichien, R. Kraus, signalait pour la première fois le

pouvoir précipitant du sérum d'animaux immuns vis-à-vis de produits bactériens ayant servi à l'immunisation [469].

Ce pouvoir précipitant nous semble aujourd'hui bien banal. Il est curieux, cependant, de constater que la floculation spécifique a été l'une des propriétés des immunsérums le plus tardivement mise en évidence : en 1897, on connaissait déjà leurs pouvoirs préventif (Richet et Héricourt [790]), agglutinant (Charrin et Roger [137]), antitoxique (Behring et Kitasato [50]) et bactériolytique (Pfeiffer [710]).

Très rapidement, on s'aperçut que cette réaction de précipitation spécifique avait une portée très générale. Bordet [80] et Tchistovitch [908] découvrirent en 1899, indépendamment l'un de l'autre, l'existence de précipitines impressionnant des matières protéiques d'origine animale. D'autres auteurs [439, 467] obtinrent des précipitines susceptibles d'agir sur des produits du règne végétal. La réaction de précipitation devint bientôt la réaction immunologique principale *in vitro,* aussi bien pour la recherche des anticorps que pour l'étude des antigènes.

Aussi, dans tous les pays du Monde, de nombreux travaux lui furent consacrés. Des applications pratiques, sérologiques, comme le titrage des antisérums, médico-légales, comme l'identification des taches de sang, furent fondées sur le principe de cette réaction.

Très rapidement, dès le début du siècle, on entreprit l'étude physicochimique des réactions de précipitation entre antigènes et anticorps. La collaboration de bactériologistes, de sérologistes, de biochimistes et de chimistes donna bientôt naissance à cette nouvelle science qu'est l'Immunochimie, dont K. Landsteiner (*) a été le véritable fondateur et l'un des plus brillants artisans.

Les études innombrables sur la réaction de précipitation

(*) K. Landsteiner est mort aux Etats-Unis, le 26 juin 1943. On trouvera la liste complète de ses publications dans *The Journal of Immunology,* 1944, t. 48, pp. 1-16.

spécifique, réaction de base de l'Immunochimie, permirent d'obtenir des renseignements importants sur la nature même des antigènes, des anticorps et sur le mode de liaison antigène-anticorps. Les biochimistes tirèrent de l'étude de ces réactions, souvent plus précises et plus fines que les méthodes d'analyse purement chimiques, des données nouvelles sur la structure des protéines et sur le mécanisme de l'activité enzymatique. Grâce à elles, on réussit à entrevoir le déterminisme chimique de la spécificité biologique.

Dès le début de nos études médicales, M. le Professeur Machebœuf, dans son cours de chimie biologique [536], attirait notre attention sur ces réactions immunochimiques et nous en montrait tout l'intérêt. Par la suite, nous avons toujours suivi attentivement le progrès des recherches dans ce domaine.

Aussi, est-ce tout naturellement vers ce côté immunologique de la biochimie que nos préférences se sont tournées. Lorsqu'en 1945, M. le Professeur agrégé Tayeau nous accueillit dans son laboratoire, nous avons commencé, sous sa direction, quelques travaux concernant le mécanisme des réactions antigène-anticorps, qui font l'objet de la partie expérimentale de ce travail.

Nous trouvons ici l'agréable occasion de lui exprimer notre gratitude et notre reconnaissance : par ses précieux conseils, par sa bienveillante attention, il nous a toujours guidé, n'épargnant ni son temps, ni sa peine. Nous avons eu la chance d'avoir un Maître qui était en même temps le meilleur des amis.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le concours des Instituts Pasteur de Bordeaux et de Paris qui, avec la meilleure grâce, nous ont toujours fourni les matières premières biologiques nécessaires.

Enfin, M. R. Pautrizel, chargé de cours de Microbiologie, a bien voulu collaborer avec nous pour toute la partie concernant les immunsérums de Lapin.

Le plan de notre travail est le suivant :

Nous avons voulu tout d'abord, dans une première partie, rappeler très brièvement au lecteur peu familiarisé aux disciplines immunologiques, quelques notions fondamentales et acquisitions modernes concernant les antigènes et les anticorps.

Dans la deuxième partie, nous avons esquissé l'étude théorique de la réaction de précipitation spécifique. Nous avons voulu insister un peu sur ce chapitre, car il n'existe pas, à notre connaissance, de revue générale récente, en langue française, sur ce sujet (*). Au cours de cet exposé, nous verrons les différentes modalités techniques d'étude de la floculation spécifique.

La troisième partie comprend l'exposé de notre travail expérimental et la discussion de nos résultats :

a) Localisation des propriétés floculantes du sérum antidiphtérique de Cheval.

b) Rôle des lipides dans la réaction de précipitation spécifique.

c) Action comparée du formol sur l'antigène et sur l'anticorps dans un système précipitant.

La rédaction de cette thèse a été pour nous l'occasion de grouper et d'ordonner nos connaissances immunochimiques. Nous serions heureux si notre modeste travail, par son caractère incomplet et ses lacunes elles-mêmes, amenait quelque lecteur à entreprendre des recherches dans ce domaine si vaste, si peu encore exploré, mais si captivant de l'immunologie.

(*) Nous sommes heureux de remercier ici M. le Bibliothécaire de l'Institut Pasteur de Paris, et le Centre de Documentation Américain (20 rue Duphot, Paris, VIII[e]), grâce à qui nous avons pu consulter l'abondante littérature immunochimique parue pendant la période 1940-1946 dans les pays anglo-saxons.

PREMIÈRE PARTIE

LES ANTIGÈNES ET LES ANTICORPS

NOTIONS FONDAMENTALES
ACQUISITIONS RÉCENTES

LES ANTIGÈNES ET LES ANTICORPS

Il est assez artificiel de vouloir définir séparément antigène et anticorps. Ces deux notions sont en effet connexes : l'antigène, c'est une substance qui, injectée par voie parentérale à un animal, provoque une réponse spécifique qui est justement l'anticorps. A l'origine, l'anticorps (*) n'était donc en somme que l'expression d'une nouvelle propriété humorale.

Voyons un exemple concret : prenons du sérum de Cheval et un Lapin neuf. Si l'on prélève un peu de sang de ce Lapin pour en extraire le sérum, on constate que l'addition de sérum de Cheval à ce sérum de Lapin ne produit aucune modification visible.

Injectons maintenant à ce Lapin quelques centimètres cubes de sérum de Cheval dans la veine marginale de l'oreille. Répétons cette opération deux à trois fois, à deux jours d'intervalle. Après une quinzaine de jours, on prélève à nouveau le sang de ce même Lapin, on en isole le sérum et on lui ajoute un peu de sérum de Cheval; on observe l'apparition d'un louche qui va en s'intensifiant, jusqu'à l'apparition de fins granules; ces granules, eux-mêmes, augmentent bientôt de taille, puis viennent se rassembler dans le fond du tube où l'on pratique l'expérience : on dit qu'il y a « floculation ».

Dans l'exemple précédent, le sérum de Cheval, substance

(*) C'est en 1899, qu'à notre connaissance, le terme « anticorps » a été employé pour la première fois [192].

étrangère injectée, constitue l'antigène. Il s'est développé dans l'organisme du Lapin une substance qui se combine spécifiquement avec cet antigène : c'est l'anticorps.

Nous allons voir bientôt que les anticorps ne sont pas simplement une expression de langage commode, mais correspondent en réalité à des substances bien définies qui ont pu être isolées.

Notons dès maintenant certains caractères fondamentaux de ce type de réactions.

a) Tout d'abord, les propriétés anticorps n'apparaissent pas immédiatement, il faut attendre un certain temps, variable d'ailleurs (*), après l'injection de l'antigène, pour déceler dans le sérum un pouvoir précipitant;

b) La réaction de précipitation est très sensible : on peut obtenir des réactions encore visibles avec des produits extrêmement dilués; la sensibilité obtenue dépasse de loin celle des procédés chimiques habituels;

c) La réaction de précipitation est hautement spécifique : on peut susciter un anticorps étroitement adapté à chaque espèce de protéine, définie par son type chimique (albumine, globuline [**], myoglobuline, etc.) et par son origine zoologique ou botanique. Dans l'exemple cité plus haut, le sérum de Lapin précipite la sérumalbumine de Cheval. Il ne précipiterait que faiblement les sérums des animaux étroitement apparentés au Cheval (Ane, Mulet) et ne précipite plus du tout les sérums des autres animaux. De même, les anticorps valables contre les protéines sanguines de l'Homme réagissent encore avec les protéines homologues des Singes supérieurs [332], mais ne réagissent plus que très médiocrement ou ne réagissent plus du tout avec les

---

(*) Le délai d'apparition de l'anticorps est en réalité assez difficile à fixer d'une manière précise. Les résultats diffèrent beaucoup suivant les méthodes employées pour caractériser l'anticorps [539].

(**) On peut différencier sérologiquement les différents protéides sériques d'une même espèce zoologique [458].

protéines des Singes inférieurs [662] ou des autres Mammifères.

Par suite de sa grande sensibilité et de sa haute spécificité, la réaction de précipitation spécifique constitue le meilleur et le plus fidèle des moyens actuellement connus pour déterminer une protéine [146], d'où les applications importantes de la floculation spécifique en médecine légale (origine des taches de sang) et dans la répression des fraudes alimentaires (conserves de viande, etc.).

CHAPITRE PREMIER

LES ANTIGÈNES

Le terme antigène (*) est souvent employé dans deux sens : tout d'abord, pour désigner des substances qui, introduites par voie parentérale chez un animal, provoquent la formation d'anticorps. Puis aussi pour caractériser des produits qui réagissent d'une manière visible avec les anticorps. En fait, ce dernier groupe renferme pratiquement les premières substances, mais l'inverse n'est pas vrai. Il y a donc toute une série de corps qui réagissent d'une manière spécifique avec les anticorps, mais qui se montrent incapables, lorsqu'on les injecte à un organisme, de susciter la production d'anticorps.

Voyons maintenant quelles sont les conditions du pouvoir antigène.

I. — CONDITIONS GÉNÉRALES DU POUVOIR ANTIGÈNE

A. — Pouvoir antigène et dimensions moléculaires

On a remarqué que les antigènes étaient des substances de poids moléculaire élevé (10.000 au moins), donnant des solutions colloïdales non dialysables à travers des membranes de collodion ou de cellophane.

L'importance de la dimension particulaire dans l'appa-

(*) On trouvera des détails complémentaires sur les antigènes dans d'excellentes revues récentes [210, 562, 72, 73].

rition du pouvoir antigène est bien marquée par le fait que des substances non antigènes, ou faiblement antigènes, peuvent le devenir lorsqu'elles sont adsorbées sur des particules de collodion, de kaolin, de charbon de bois, etc. [312, 486, 720, 440, 630, 934].

Boyd [93] a même pu montrer que le simple fait d'ajouter à une solution d'antigène une suspension de microbes tués, par exemple, suffisait à augmenter son pouvoir antigénique : il a pu ainsi obtenir de bons antisérums réagissant avec des antigènes faibles, comme l'hémoglobine. Ces résultats sont susceptibles d'ailleurs d'une autre interprétation depuis que Ramon [754, 756] a montré que la production d'anticorps est stimulée par l'injection de substances inertes, comme le tapioca ou le phosphate tricalcique (*). Ces substances inertes agiraient en provoquant des réactions cellulaires favorables à l'élaboration des anticorps [84].

B. — Spécificité zoologique et tissulaire de l'antigène

Une deuxième loi, très générale, veut qu'une substance, pour être antigène, soit étrangère à l'individu à qui on l'injecte. On ne peut immuniser un Chien, par exemple, avec son propre sérum ou avec le sérum d'autres Chiens. Un animal ne produit pas d'anticorps vis-à-vis d'une substance que l'on trouve normalement dans sa circulation.

Il faut noter cependant qu'il est possible, quelquefois, d'immuniser un sujet avec des produits dérivés de son propre organisme (**), si ces produits ne se trouvent pas habituellement dans son torrent circulatoire : c'est ainsi que les protéines du cristallin sont de bons antigènes, même vis-à-vis des animaux de l'espèce dont provient ce cristallin (Uhlenhuth [933]) (***). Lewis a même montré qu'on pouvait préparer un Cobaye avec le cristallin d'un

(*) Voir aussi [955].

(**) Ce sont des « iso-antigènes », antigènes pour des individus de la même espèce que celle de l'animal qui les a fournis.

(***) Voir aussi [465, 470, 385, 389, 975, 228, 97, 981].

de ses yeux et, plus tard, obtenir chez ce même rongeur un choc anaphylactique typique par injection du broyat du cristallin de l'autre œil. Ce même auteur a pu obtenir chez les Chèvres, en période de lactation, des anticorps contre leur propre caséine, anticorps qui réagissent également avec la caséine du lait de Vache [514]. D'autres auteurs ont démontré l'existence d'iso-anticorps vis-à-vis de la thyroglobuline [874], du fibrinogène et de certains extraits de cerveau [516].

L'expérimentation a même permis de réaliser chez un animal l'apparition d'auto-anticorps : auto-anticorps spermotoxiques [604, 388, 261] ; on a signalé aussi la possibilité de formation, chez les jeunes animaux, d'anticorps impressionnant le sérum des vieux animaux de la même espèce (Picado [712]). Il existe donc, au point de vue antigénique, des différences entre les sérums d'individus jeunes ou âgés.

C. — Nature protéidique des antigènes

Dès le début des études immunologiques, on s'est rapidement aperçu que le plus souvent, l'existence du pouvoir antigène était liée au caractère protéidique des produits essayés. Il est généralement impossible de produire des anticorps réagissant sur des substances chimiques simples, cristallisables et non protéidiques, comme les glucides, les lipides ou les alcaloïdes. D'autre part, les protéides, même lorsqu'on les purifie avec soin, se comportent le plus souvent comme d'excellents antigènes.

Toute substance qui détruit les protéines d'un milieu lui enlève de ce fait ses caractères antigéniques. Wells [8], dans un travail déjà ancien, avait indiqué que le pouvoir d'engendrer l'état anaphylactique ou d'intoxiquer les animaux sensibilisés décroît lorsqu'on soumet à la digestion pepsique ou trypsique du sérum de Bœuf ou de l'ovalbumine, et décroît parallèlement à la proportion d'azote coagulable.

Wells [8], Ten Brœck [910], Landsteiner [481] ont

montré que le pouvoir antigène, s'il résiste assez bien au traitement par les acides forts, disparaît aisément sous l'action des alcalis : à la température du laboratoire, les protéines sériques perdent, à *p*H 13, leur aptitude à réagir avec la précipitine correspondante [444, 455]. Dans ces conditions, ces protéines sont racémisées et ne sont plus attaquables par les ferments [159].

Dans une solution d'antigène, tout réactif qui précipite quantitativement les protéides supprime de ce liquide tout pouvoir antigénique.

Les protéides sont donc des antigènes. Ont-ils le monopole de la qualité antigénique ? La question est restée longtemps en suspens. Certains auteurs ont fait observer que toutes les protéines n'étaient pas des antigènes : l'hémoglobine est un antigène très faible [379], la salmine, protamine provenant du sperme de Saumon, ne l'est pas du tout [907] (*). Il en est de même de la gélatine : on a voulu expliquer ce fait par l'absence de tyrosine ou de tryptophane dans la composition de cette molécule, mais l'introduction artificielle de noyaux aromatiques dans la gélatine ne suffit pas à lui conférer l'antigénicité [418] (**).

On a souvent signalé l'isolement de substances non protéidiques qui présentaient cependant un pouvoir antigénique évident : le plus souvent, des travaux ultérieurs ont pu déceler finalement dans ces préparations des impuretés protéidiques qui avaient échappé aux premiers auteurs, et à qui on pouvait imputer l'activité antigénique.

Depuis une dizaine d'années, cependant, les magnifiques travaux d'Avery, de Dubos, de Gœbel, aux Etats-Unis; de Boivin et Mesrobeanu, de Raistrick et Topley, en Europe, ont conduit les immunologistes à admettre l'existence réelle d'antigènes non protéidiques.

Nous étudierons donc tout d'abord les antigènes protéi-

(*) On n'observe de même aucun accident anaphylactique avec les préparations d'insuline-protamine-zinc (Aubertin).

(**) Tout au moins dans certaines conditions. Voir [407, 150].

diques, ce qui nous permettra de comprendre quels peuvent être les facteurs de la spécificité d'un antigène.

Nous passerons ensuite rapidement en revue les antigènes non protéidiques.

II. — LES ANTIGÈNES PROTÉIDIQUES (*)

Nous avons vu la haute spécificité des réactions immunologiques. Deux protéines de même type chimique, deux pseudo-globulines par exemple, peuvent avoir des caractères physicochimiques absolument identiques : mêmes solubilités, mêmes *p*H isoélectriques, mêmes poids moléculaires, mêmes compositions en aminoacides. Cependant, on arrive, si elles proviennent de deux espèces différentes, à les différencier très aisément par leurs caractères antigéniques.

C'est qu'un même type d'assemblage d'aminoacides est susceptible de présenter un nombre énorme d'isomères : si deux molécules protéidiques sont constituées toutes deux par l'union des mêmes aminoacides, elles peuvent différer par l'emplacement relatif qu'occupent ces aminoacides dans les chaînes peptidiques. Bien plus, des travaux récents (ultracentrifugation, mesures de diffusion) ont établi que de nombreuses protéines possèdent une forme « globulaire » (ou ellipsoïdale), ce qui indique une organisation plus élevée qu'une simple chaîne ou qu'un système de chaînes peptidiques. Les chaînes d'aminoacides sont plus ou moins repliées sur elles-mêmes, présentent une « structure secondaire » qui apporte encore un nouveau facteur d'isomérie. Les possibilités infinies de variétés d'arrangement de ces moellons élémentaires de la molécule protéidique que sont les aminoacides, permettent d'expliquer le nombre lui-même infini d'antigènes différents.

Lorsqu'on modifie certains facteurs physiques, on modifie

(*) Le lecteur trouvera des renseignements plus complets sur la structure des protéines dans le Manuel de Biochimie Médicale de Polonovski [723] et dans un article de Boulanger [85].

la molécule protéidique, on la dénature (*) : les fragiles liaisons qui maintenaient repliées les chaînes peptidiques sont rompues, de nouvelles se créent et dans ces conditions, il apparaît un nouvel antigène plus ou moins apparenté à l'antigène initial. Remarquons que, dans ce nouvel antigène, les aminoacides sont toujours les mêmes, qu'ils sont toujours soudés les uns aux autres dans le même ordre : seules leurs positions relatives dans l'espace ont été modifiées.

C'est ainsi, par exemple, qu'un sérum chauffé vers 80° et dilué pour empêcher la coagulation par la chaleur, se modifie au point de vue antigénique. Obermayer et Pick [663], Schmidt [844] ont constaté qu'il n'est plus précipitable par le sérum d'animaux auxquels on a injecté le même antigène non chauffé; ces faits ont été confirmés par la suite par Fujiwara [286], Bruynoghe [107], Nicolas et Katrandjeff [649], et d'autres auteurs [268, 59, 851, 991, 584, 861, 632, 464]. Si le chauffage des protéines en solution détruit leur pouvoir de se combiner avec les anticorps, leur caractère antigène, lui, n'est pas perdu, et des protéines chauffées peuvent souvent encore susciter la production d'anticorps [211] ou se combiner avec les anticorps réagissant avec les protéines natives [352] (**). On a même signalé [288] que des précipitines vis-à-vis de protéines chauffées réagissaient souvent avec des protéines chauffées appartenant à une autre espèce animale. Umazumi [935] a obtenu des précipitations en injectant du sérum de Lapin chauffé à 120° C. On a même pu modifier, par chauffage ou refroidissement modérés *in vivo,* la spécificité des protéines de l'animal soumis à l'expérience (Karady [450]).

Basset, Machebœuf et Pérez [43], comprimant un sérum à 4.500 atmosphères, modifient également ses caractères antigéniques. Pérez [703] obtient un résultat analogue par action des ultrasons sur des pseudoglobulines.

(*) Au sujet de la dénaturation des protéines, voir [22, 645].

(**) Il en est de même des protéines solubilisées dans un milieu non aqueux [702].

Les chercheurs se sont aussi demandé si l'on peut obtenir une nouvelle spécificité, non plus, comme dans les expériences précédentes, par une altération globale de la molécule protéinique, mais par une modification élective de telle ou telle fonction. Les chimistes, pressentant donc l'importance de groupements chimiques particuliers dans le déterminisme de la spécificité antigénique, ont abordé le problème sous deux angles :

a) Ils ont cherché à altérer d'une manière précise une fonction chimique déterminée de la molécule protéidique;

b) Ils ont soudé aux protéines des fonctions chimiques, des molécules ou des chaînons nouveaux.

Dans les deux cas, ils ont étudié et comparé avec l'ancien le nouveau composé obtenu. On a pu, de cette manière, préciser le rôle des différentes fonctions chimiques dans la fixation de la spécificité antigénique.

A. — Modifications de certaines fonctions chimiques de la molécule protéidique

Obermayer et Pick [664] ont cherché à modifier les cycles phénoliques contenus dans les protéides, soit par action de l'acide nitrique, soit par action des halogènes. On obtient ainsi un nouvel antigène, nitroprotéide (ou xanthoprotéide) ou protéide halogéné (bromé ou iodé), antigène qui, injecté à l'animal, donne naissance à des anticorps inactifs vis-à-vis des protéides originels, mais actifs vis-à-vis de tous les protéides traités de la même façon, quelle qu'en soit l'origine, animale ou végétale. La nitration (ou l'halogénation) d'un protéide fait donc disparaître sa spécificité première et la remplace par une spécificité de fonction. Ces travaux ont été encore précisés récemment [982, 863, 631, 79, 463].

D'autres agents, comme le formol, se combinent avec les fonctions aminées, introduisent dans la protéine des groupe-

ments méthyléniques (*) et produisent des effets analogues. Injecté au Lapin, le sérum de Lapin formolé suscite l'élaboration d'anticorps [484]. Mais, dans ce cas, la marque d'origine existe toujours : l'anticorps n'agit pas sur les sérums formolés provenant d'autres espèces. Injecté à un animal d'une espèce différente, le sérum de Lapin formolé donne lieu à la production d'anticorps qui réagissent avec l'antigène natif aussi bien qu'avec l'antigène formolé [236, 488].

De nombreux travaux analogues ont été effectués en utilisant des protéines méthylées [478], acétylées [489, 825], oxydées [4], réduites [69], désaminées [515], diazotées [492, 490, 982], des protéines traitées par l'acide sulfurique [492], par l'ypérite [53] ou par la ninhydrine [213].

La conclusion de toutes ces études est que la spécificité d'une protéine est directement liée à sa constitution chimique : ce sont les cycles aromatiques et les fonctions susceptibles d'acquérir une charge électrique (**) (fonctions $-NH_2$, $-COOH$, etc.) dont l'influence est la plus marquante.

B. — Couplage de nouveaux chaînons aux protéides

Les auteurs dont nous venons de citer les travaux n'avaient fait que modifier certaines fonctions existant dans la protéine originelle. D'autres ont voulu faire un pas de plus et ont soudé à la molécule protéidique de nouveaux groupements, synthétisant ainsi des benzoylprotéines [601], des carboxybenzoylprotéines [293], des phényluréidoprotéines [418, 333] ou des complexes protéines-savons (***).

(*) Tout au moins en première approximation. Nous aurons l'occasion, par la suite (troisième partie, chapitre III), d'étudier plus longuement l'action du formol sur les protéides.

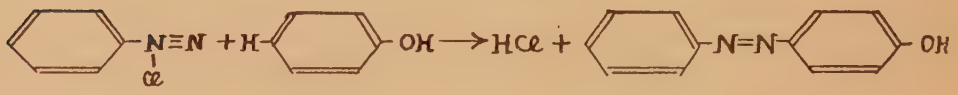
(**) On donne à ces différents groupements le nom de fonctions « polaires »; ces fonctions sont situées à la surface de la molécule et dirigées vers le milieu aqueux extérieur.

(***) Tayeau [887] a étudié quelques propriétés immunologiques des protéines sériques ainsi traitées. Le départ des lipides et la création de nouvelles cénapses protéines-savons ne modifie pas la spécificité immunologique originelle.

Fujio [285] traita des protéines par le sel de sodium, de l'acide β napho-quino-sulfonique; Clutton les soumit à l'action des azides [151, 152]. On a aussi essayé de fixer des radicaux sur les groupes — SH des protéines [717].

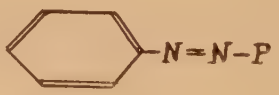
Mais, en réalité, c'est à Landsteiner [490] que revient le mérite d'avoir appliqué aux protéines une méthode à la fois générale, souple et pratique, permettant de modifier au gré de l'expérimentateur l'allure chimique d'un antigène protéidique.

Déjà amorcée par Pauly [699], cette méthode est basée sur le principe suivant : un sel de diazonium s'unit en milieu alcalin à un phénol pour donner un dérivé oxy-azoïque. Par exemple :



Chlorure de benzène diazonium — Phénol — Oxy azoïque

Les protéines comprennent des groupements phénoliques libres : ceux de la tyrosine. Si nous remplaçons, dans la réaction précédente, le phénol par un protéide P, nous allons obtenir un benzène-azo-protéide, substance colorée en rouge et répondant à la formule :



Nous voyons qu'en somme le noyau benzénique est soudé au protéide, au niveau d'un reste de tyrosine, par l'intermédiaire du chaînon diazo : — N = N —.

Or, au lieu de partir simplement de l'aniline pour synthétiser notre sel de diazonium, nous aurions pu partir de n'importe quelle amine aromatique substituée, l'un ou plusieurs des hydrogènes nucléaires étant remplacés par

une substance organique quelconque, S. Le nouvel azoprotéide obtenu serait alors :

que nous pouvons écrire, en simplifiant :

S — D — P (*).

Nous sommes ainsi en possession d'une méthode extrêmement commode qui permet de souder à une protéine n'importe quelle substance S, dont on veut étudier l'influence sur la spécificité antigénique.

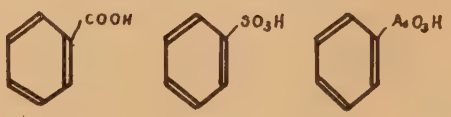
Quelles sont les propriétés de ces azoprotéines ? Si nous injectons à un Lapin un composé obtenu par copulation de sérum de Cheval avec l'acide arsénique, par exemple, nous constatons bientôt l'apparition d'anticorps réagissant très fortement avec cet « antigène conjugé artificiellement ». Mais nous constatons en outre, dans le sang de cet animal, des précipitines vis-à-vis du sérum de Cheval natif et surtout des précipitines vis-à-vis de tout protéide-azo-acide arsénique, par exemple un dérivé préparé à partir de sérum de Mouton. L'introduction du groupement arsénique a donc fait apparaître une nouvelle spécificité antigénique, spécificité de fonction chimique.

Quels résultats ont donné les travaux effectués grâce à cette méthode ?

a) Les fonctions acides et les fonctions aminées, les premières surtout, jouent un rôle très important dans la création du nouveau caractère antigénique. On réalise par exemple trois antigènes artificiels conjugués chacun respectivement avec l'un des trois acides suivants : acide benzoï-

(*) Chaque molécule de protéine contenant de nombreux restes de tyrosine, on peut synthétiser toute une gamme d'antigènes contenant plus ou moins de chaînons diazotés.

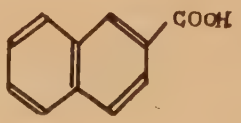
que (1), acide benzène sulfonique (2) et acide benzène arsénique (3) :



(1) (2) (3)

Les trois antigènes sont très voisins, puisqu'ils ne diffèrent que par la nature intime de leur fonction acide. Cependant, les anticorps correspondant à ces trois dérivés diffèrent, et un antisérum, s'il réagit avec les trois antigènes, réagit beaucoup plus fortement avec celui qui lui a donné naissance.

Au contraire, le cycle benzénique, support de la fonction acide, a un rôle beaucoup plus effacé : l'anticorps antibenzoïque réagit presque aussi bien avec l'antigène synthétique dans lequel le cycle benzénique serait remplacé par un cycle naphtalénique, sous forme d'acide naphtoïque.



Les fonctions non polaires, telles que les radicaux CH_3 —, CH_3O —, NO_2 —, Cl —, Br —, I —, introduisent une spécificité assez faible et peu rigoureuse.

Il ne faudrait pas croire, cependant, qu'une fonction chimique suffise, par elle-même, à déterminer entièrement la spécificité antigénique. Un travail de Mutsaars et Grégoire [633] est particulièrement démonstratif : les antigènes dans lesquels le groupement S est lié à une protéine par une liaison azo, comme P — N = N — S, ne sont pas équivalents à ceux chez lesquels S est lié à la même protéine par l'intermédiaire de la lysine (liaison amide), comme P — NH — CO — S.

Le protéide combiné au groupement déterminant joue lui aussi un rôle non négligeable : un sérum obtenu en immunisant un animal avec un antigène synthétique A, préparé avec une protéine A (par exemple : sérum globuline de Cheval-azo-acide benzène arsénique), donnera un précipité bien plus abondant avec un antigène B renfermant la protéine B, proche parente de la protéine A (sérum globuline de Chien-azo-acide benzène arsénique), qu'avec un antigène C, fait d'une protéine éloignée de A (gliadine-azo-acide benzène arsénique). Cependant, l'antisérum ne donne pas plus de précipité avec la protéine B qu'avec la protéine C.

b) La position réciproque des diverses fonctions a souvent plus d'influence que la nature même de ces fonctions [494].

L'anticorps, formé par immunisation avec le dérivé P — D — acide ortho-amino-benzène sulfonique, ne réagit que très faiblement vis-à-vis des azoprotéides renfermant les acides para- ou méta-amino-benzène sulfoniques, mais réagit au contraire assez fortement avec les antigènes P — D — acide ortho-amino-benzène arsénique ou P — D — acide ortho-amino-benzène sulfonique.

De même, les isomères optiques d'un acide organique, comme l'acide tartrique [495], sont facilement séparables par ces méthodes immunochimiques quand on les introduit dans l'édifice moléculaire d'un azoprotéide.

Lorsque les radicaux conjugués à la protéine ont une dimension suffisante, la spécificité antigénique devient un peu moins étroite, car les chaînes peuvent subir des torsions : c'est ainsi, par exemple, que les anticorps précipitant les azoprotéides contenant le corps

$$C_6H_5 — NH — CO — (CH_2)_4 — COOH$$

donnent aussi des réactions croisées avec

$$C_6H_5 — NH — CO — (CH_2)_6 — COOH.$$

c) Landsteiner et ses collaborateurs ont enfin cherché à produire des antigènes artificiels voisins des protéides

naturels, en prenant pour S des aminoacides ou des polypeptides. Ils ont pu ainsi constater que, dans une chaîne peptidique, chaque aminoacide peut avoir son influence propre sur la spécificité, mais que c'est l'acide aminé terminal, celui dont la fonction acide est libre, qui agit le plus fortement sur les caractères antigéniques.

Il ressort de tous ces travaux, effectués en majeure partie par Landsteiner et son école [4], que la spécificité d'un antigène dépend pour une grande part de sa constitution chimique. On n'a aucune preuve que la taille des particules [870, 572, 919] ou leur structure micellaire [880, 881, 57] influencent la spécificité. Au contraire, des différences de constitution chimique minimes, de simples modifications dans la position spatiale de certaines fonctions jouent un grand rôle dans la réactivité des antigènes.

L'opinion d'Ehrlich, suivant laquelle les propriétés sérologiques sont intimement liées à la constitution chimique, est maintenant amplement démontrée. Les travaux de Wells et Osborne, sur les protéines végétales [8], ont bien montré la primauté de la structure chimique sur l'origine biologique.

Ceci nous conduit à envisager l'existence, dans la molécule d'antigène, d'un ou de plusieurs groupements responsables des caractères spécifiques : ce sont les « groupements déterminants ». Leur agencement réciproque dans l'espace constitue un « motif spécifique » qui donne à l'antigène son individualité immunologique.

Ces motifs spécifiques sont manifestes dans la molécule d'un antigène synthétique, d'une azoprotéine conjugée. Il est au contraire encore difficile, à l'heure actuelle, de préciser la constitution de ces motifs antigéniques dans les protéines naturelles, et d'interpréter leurs réactions immunologiques en termes de structure chimique. Il est vrai que nos connaissances sur la structure intime des protéines sont encore rudimentaires.

On ne connaît guère la dimension de ces motifs spécifiques. On a pu se faire une idée sur leur taille en étudiant les réactions d'inhibition par les produits d'hydrolyse de la soie, produits qui ne contiennent pas plus de huit à douze aminoacides [480]. De toute évidence, les groupements déterminants de petite taille, suffisants dans les réactions avec les antigènes conjugués (aminoacides, di ou tripeptides), ne peuvent fournir le nombre de combinaisons nécessaires à expliquer l'énorme variété des réactions avec les protéines, et la spécificité, pour permettre un modèle caractéristique pour chaque espèce, doit nécessiter des structures plus compliquées existant probablement dans la molécule. On sait cependant que la forme globulaire n'est pas une condition nécessaire à l'obtention de réactions spécifiques, puisque les chaînes polypeptidiques des protéines fibreuses [33] et des protéines étalées en lames minces [806, 807] conservent des caractères antigéniques. On pourrait penser que l'effet spécifique est apporté par une somme de réactions partielles ou, en d'autres termes, par l'action combinée de plusieurs anticorps, dirigé chacun vers un petit groupement déterminant particulier : cette hypothèse ne cadrerait pas avec le fait qu'il y a très rarement des réactions croisées entre protéines non voisines, même lorsqu'on utilise à la fois plusieurs antigènes pour l'immunisation [795, 290, 386, 387, 168, 67]. Par ailleurs, on ne peut mettre en évidence d'anticorps spécifiquement adaptés à des résidus d'aminoacides dans des sérums antiprotéidiques [4] (*).

III. — NOTION DE HAPTÈNE

Les travaux de Landsteiner, sur les azoprotéines, ont aussi permis de mettre en évidence un fait nouveau : une substance S, non antigénique, le devient par combinaison avec un protéide P, en donnant l'azoprotéide P — D — S.

(*) Au sujet des antigènes modifiés, consulter [357, 138].

L'injection de ce dernier produit à un animal suscite la formation d'anticorps.

La substance S est capable de s'unir avec l'anticorps ainsi formé, pour donner quelquefois un précipité, le plus souvent pour inhiber toute réaction ultérieure de l'anticorps avec l'azoprotéide. On appelle une telle substance un « haptène ». Pour reprendre la définition même de Landsteiner, ces produits sont : « *... specific, protein free, although reactive in vitro, induced no or only slight antibody response. For serologically active substance of this sort, in contradiction to the protein antigens which possess both properties, the term hapten has been proposed* ».

Lorsqu'on unit artificiellement un haptène à un protéide, on obtient donc un antigène complet.

On a montré ensuite que cette notion de haptène ne s'appliquait pas seulement aux amines aromatiques substituées entrant dans la fabrication des azoprotéines, mais que de telles substances non protéidiques étaient particulièrement fréquentes dans la nature.

A. — Haptènes polyosidiques

Dochez et Avery [198] constatèrent, en 1917, que non seulement dans les cultures, mais encore *in vivo*, le pneumocoque produit une matière soluble dans l'eau, précipitable par l'alcool, résistant à l'ébullition et à l'action de la trypsine. On la retrouve dans le sang ou dans l'urine des animaux infectés.

En 1923, Heidelberger et Avery [361, 376] ont réussi à isoler cette substance des capsules de pneumocoques de différents types : elle n'est pas antigénique, mais elle réagit spécifiquement avec l'antisérum préparé par injection à l'animal de corps microbiens du type correspondant. Cette substance a été soumise à une analyse très poussée [302]. Elle est composée de macromolécules, polymères de chaînons élémentaires formés par l'union osidique de molécules

de glucose et d'acide glycuronique. Suivant le type de pneumocoques étudié, on peut avoir aussi des polyosides composés d'acide galacturonique ou d'oses azotés (osamines). Heidelberger et Avery, nous l'avons dit, considéraient les polyholosides des pneumocoques comme des haptènes, et attribuaient à l'hypothétique antigène « complet », existant *in vivo*, une structure glucido-protéidique. Personne n'est encore parvenu à extraire cet antigène complet des corps microbiens.

Si l'on prépare des azoprotéines avec ces polyosides comme substances déterminantes, on obtient de véritables antigènes susceptibles de faire naître des anticorps homologues. On confère ainsi à l'animal une immunité antipneumococcique importante. Gœbel a pu obtenir le même résultat avec un antigène purement synthétique, réalisé par l'union d'une protéine banale avec l'acide cellobiouronique : pour la première fois dans l'histoire de l'immunologie, on est parvenu à protéger un animal contre l'infection à l'aide d'un vaccin créé de toutes pièces au laboratoire; ce fait, extrêmement remarquable, laisse prévoir une orientation nouvelle de la thérapeutique immunochimique.

D'autres polyholosides analogues ont été extraits de la bactéridie charbonneuse [304, 923, 742, 846, 289, 995, 867, 303], du bacille capsulé de Friedländer [922], etc.

B. — Haptènes lipoïdiques

On s'est demandé si les substances que l'on peut obtenir par extraction d'un matériel antigénique au moyen de certains solvants organiques, comme l'alcool, pouvaient réagir avec les anticorps que l'injection de ce matériel total a suscités.

Dans plusieurs cas, les expériences furent couronnées de succès; on constata, de plus, que les substances alcoolosolubles sont dépourvues le plus souvent de pouvoir antigène : ce sont des haptènes, et comme ces haptènes ont été

extraits au moyen de solvants des graisses, des « haptènes lipoïdiques ».

Nous n'en citerons qu'un exemple : Forsmann [269], injectant à des Lapins différents broyats d'organes, obtint avec le rein de Cobaye un sérum susceptible de floculer des suspensions obtenues avec l'extrait alcoolique de cet organe. Bien plus, les extraits alcooliques d'organes d'animaux très divers, extraits d'hématies de Mouton, de reins de Cheval, de tissus d'Hommes des groupes A et B, se comportent d'une manière analogue. Landsteiner et Levine [491], puis Brunius [106] ont montré que les extraits alcooliques libéraient, par hydrolyse, des acides gras et des oses, mais pas d'acides aminés.

Il existe encore bien d'autres haptènes lipoïdiques sur lesquels nous ne pouvons insister ici : les plus connus sont le haptène de Wassermann [960, 260] et surtout le haptène lipoïdique du Bacille Tuberculeux, bien étudié par Machebœuf [554] et M^lle^ Faure [250].

Signalons enfin l'existence de haptènes de constitution chimique toute différente, comme le haptène polypeptidique de la capsule du Bacille de l'Anthrax [435].

IV. — LES ANTIGÈNES NON PROTÉIDIQUES

Nous venons de voir que les protéides étaient en général d'excellents antigènes, et que la majorité des antigènes animaux, végétaux ou bactériens étaient de nature protéidique. Cette opinion a prévalu jusqu'à ces dernières années.

A l'heure actuelle, à la suite de multiples travaux, la réalité de l'existence d'un pouvoir antigène limité, médiocre, est définitivement acquise pour différentes substances non protéidiques et susceptibles d'être isolées à l'état de grande pureté.

A. — Les antigènes polyosidiques

Divers auteurs (*) ont obtenu, à partir du pneumocoque du type I, des préparations solubles qui, utilisées à petites doses chez la Souris, se sont montrées antigéniques et protègent spécifiquement ces animaux contre l'infection expérimentale [704, 705, 831, 832, 238, 951]. L'Homme peut aussi être vacciné très efficacement avec ces préparations [573].

Avery et Gœbel [34] purent isoler des capsules microbiennes, en évitant soigneusement l'emploi de tout réactif alcalin, une substance non protéidique antigénique : il s'agissait d'un polyoside acétylé; ce dérivé glucidique provoque la formation d'anticorps chez la Souris, mais non pas chez le Lapin [240, 680]. Chez la Souris, d'ailleurs, l'immunisation est plus difficile à obtenir qu'avec un antigène protéidique : il faut injecter de petites quantités, judicieusement choisies, de ce polyoside; si l'on opère avec des doses trop fortes, la Souris, loin d'être immunisée, est au contraire sensibilisée vis-à-vis de l'infection pneumococcique.

B. — Les antigènes de Boivin

En 1933, employant une méthode de précipitation trichloracétique, Boivin et Mesrobeanu parvinrent à isoler des variantes S des *Salmonella* un complexe fortement et régulièrement antigénique [77]. La nature chimique de ce complexe a pu être précisée : la majeure partie est constituée de polyosides et de lipides, d'où leur nom d' « antigènes glucidolipidiques ». Il y a toujours dans ces antigènes une petite fraction azotée, probablement polypeptidique [429]. En tout cas, l'absence de protéines est bien certaine [620, 622].

C. — Les antigènes de structure chimique simple

Les cliniciens connaissent bien les phénomènes de sensibilisation et d'anaphylaxie causés par des composés

(*) Voir la bibliographie complète dans [71].

organiques très simples ou même par des produits purement minéraux. Les phénomènes d'intolérance sont étroitement apparentés aux réactions d'immunité. On s'est demandé si ces substances n'étaient pas douées de pouvoir antigénique.

Le plus souvent, les expériences réalisées donnèrent des résultats négatifs. Dans quelques cas particuliers cependant, des chercheurs ont mis en évidence un caractère antigénique chez des composés de structure chimique très simple.

Fierz et ses collaborateurs ont montré le pouvoir antigène de molécules non protéidiques : l'oléyl-N-Méthyl-Taurine, par exemple, sensibilise le Cobaye [258] ; remarquons les grandes dimensions moléculaires de ce produit, qui atteignent 25 Å. Armand a pu obtenir des anticorps par injection de composés azoïques simples, comme l'acide sulfaliniqueazo-tyrosine [24].

Landsteiner et ses collaborateurs ont eu des résultats analogues avec les nitrochlorobenzènes et toute une série de substances chimiques de poids moléculaire peu élevé [139, 482, 483, 487]. Enfin, tout récemment, Loiseleur [530, 533, 535, 536] a pu obtenir des réponses spécifiques après injection de produits organiques simples : oses, alcools, acides organiques et leurs sels, colorants, sulfamides, alcaloïdes, etc. Les molécules, introduites dans l'organisme à une cadence suffisamment rapide, proportionnelle à leur diffusibilité et pendant un temps assez long, impriment à certains protéides sanguins une empreinte permanente. Des réactions sériques particulièrement intéressantes sont celles qui se développent au cours du traitement par les antibiotiques [537], dont la posologie répond justement aux conditions que nous venons d'énoncer.

On peut d'ailleurs supposer que ces substances chimiques simples acquièrent des propriétés antigéniques en se combinant, dès leur injection dans l'organisme, aux propres protéines de l'animal, conférant à ces dernières une nouvelle spécificité : ce sont ces protéines modifiées qui joueraient

alors le rôle d'antigènes. En effet, toute une série de composés chimiques simples, différant les uns des autres mais possédant en commun la propriété de s'unir facilement aux protéines, a permis à Gell [295] d'obtenir la formation de précitines chez le Lapin.

Rosenthal a confirmé cette hypothèse [799] ; il injecte à un Chien de grandes quantités de phénolphtaléine, puis prélève son sérum qu'il injecte à des Lapins : ceux-ci deviennent sensibles au colorant ; or, l'injection de phénolphtaléine seule n'aurait pas suffi à sensibiliser ces animaux. Il faut donc admettre que la phénolphtaléine s'était liée aux protéines sériques du Chien et leur avait fait acquérir une nouvelle orientation antigénique.

CONCLUSIONS

Deux points sont importants à retenir dans ce chapitre :

— la spécificité d'un antigène est étroitement liée à sa structure chimique, et plus particulièrement à certaines fonctions polaires, dont la disposition spatiale forme un « motif » caractéristique de cet antigène ;

— le pouvoir antigénique marche de pair avec des dimensions moléculaires (ou particulaires) importantes : d'où l'importance des protéines dans ce domaine ; si de petits composés manifestent des caractères antigéniques indiscutables, c'est qu'en réalité ils s'unissent ou sont adsorbés par des macromolécules.

Pour susciter une réponse immunologique, le matériel antigénique doit arriver aux cellules productives d'anticorps. On imagine facilement que la facilité de capture du complexe antigène par phagocytose ou colloïdopexie puisse se montrer fort variable selon le mode de « présentation » de ce matériel. Ceci explique les différences quantitatives de pouvoir antigène d'un polyoside, par exemple, selon qu'il se trouve libre, lié à une protéine, adsorbé sur de l'alun ou encore à la surface d'une bactérie. On peut comprendre

ainsi l'inégale capacité que montrent les diverses espèces animales pour former des anticorps (faculté plus ou moins grande de capturer l'antigène de la part des cellules productrices d'anticorps) et aussi la valeur inégale des diverses voies d'administration d'un antigène donné chez une même espèce animale (différences dans la nature et le nombre des cellules atteintes par l'antigène) (Boivin [44]).

CHAPITRE II

LES ANTICORPS (*)

Au début de l'immunologie, les anticorps étaient des susbstances purement hypothétiques : on les nommait et on les caractérisait selon les réactions auxquelles ils donnaient naissance [508].

Les efforts des chercheurs ont permis, au cours des trente dernières années, de se faire actuellement une idée assez précise sur la nature chimique des anticorps, leur lieu et leur mode de formation.

Nous examinerons successivement ces trois différents points.

I. — CONSTITUTION CHIMIQUE DES ANTICORPS

Jusqu'à ces dernières années, le problème capital que posaient les anticorps aux immunochimistes était le suivant : sont-ils ou non des protéides ?

A. — Nature protéidique des anticorps

Dès les premiers travaux, on s'est aperçu que les anticorps, s'ils n'étaient pas des protéides, étaient du moins toujours étroitement unis à ces derniers : comme eux, ils

(*) Nous avons été très aidé, pour la rédaction de ce chapitre, par une mise au point récente et détaillée de Machebœuf [560]. Voir aussi [317, 563, 979].

ne dialysent pas; leur vulnérabilité vis-à-vis de divers agents physiques est la même.

C'est ainsi, par exemple, qu'en étudiant leur inactivation par la chaleur, Streng [876], bientôt suivi par d'autres auteurs [578, 969, 149], a pu montrer que leur dénaturation en fonction du temps obéissait à la même loi que la dénaturation des protéines. Les agents qui empêchent la coagulation par la chaleur se comportent d'une manière identique vis-à-vis des protéines et des anticorps [860]. Ces expériences n'excluent cependant pas la possibilité que les anticorps soient des substances non protéiques adsorbées sur le coagulum albumineux obtenu par chauffage de l'immunsérum.

Des résultats tout à fait analogues ont été obtenus en étudiant comparativement l'action de réactifs dénaturants sur les protéides et sur les anticorps [602, 603, 984, 985].

L'étude de l'action de diverses protéases (pepsine, trypsine, papaïne) sur les anticorps a montré quelques différences par rapport à la dégradation des protéines ordinaires [432, 100, 682, 798, 318, 319, 614, 615, 729, 731, 829, 658, 659, 929, 453, 931, 297, 707] mais, cependant, tous les anticorps peuvent être en définitive hydrolysés par voie enzymatique, rapidement par la pepsine, plus lentement par la trypsine. La destruction de la précipitine est parallèle à l'augmentation de l'azote aminé [148]. Cette résistance relative des anticorps, tout particulièrement des antitoxines, a permis de mettre au point des méthodes de digestion sélective pour préparer des immunsérums purifiés [683, 728, 820, 819].

On a aussi traité les anticorps par des réactifs modifiant électivement tel ou tel groupement des protéines (cétène [147, 824, 822, 309, 95], formol [voir p. 206], monobromacétate de sodium [700], détergents [402]). Les conclusions de tous ces travaux peuvent s'exprimer ainsi : « Toutes les réactions que l'on sait devoir agir sur des fonctions chimiques définies modifient les anticorps dans les condi-

tions où elles modifient les protéides du sérum. Bien plus, on a pu, lorsque la réaction inverse est possible, régénérer l'activité disparue : il a suffi pour cela de se placer dans des conditions qui, pour un protéide quelconque, le font revenir à son état initial. Tout se passe donc comme si les anticorps étaient de nature protéidique ». (Machebœuf.)

B. — Isolement des anticorps

Rappelons que l'on peut distinguer parmi les protéines normales du sérum sanguin trois fractions principales (*) :

— l'euglobuline, insoluble dans l'eau pure, soluble seulement en présence de sels neutres, et qui précipite par adjonction de sulfate d'ammonium au tiers de saturation;

— la pseudoglobuline, soluble dans l'eau, et qui précipite à demi-saturation en sulfate d'ammonium;

— la sérum albumine qui exige la saturation complète pour s'insolubiliser totalement.

Notons d'ailleurs que la distinction entre ces deux variétés de globulines est souvent assez délicate et varie selon la technique employée [145, 569, 594] (**).

La teneur du sang en globuline s'élève souvent au cours de l'immunisation, surtout si l'animal souffre [199, 55, 499, 433]. Bjœrneboe [66], examinant 56 Lapins en cours d'immunisation antipneumococcique, arrive à la conclusion que l'augmentation des protéines sériques était entièrement due à l'apparition de la protéine anticorps. Avec les mêmes antigènes, Liu, Chow et Lee [524] n'avaient pu expliquer de cette manière que les deux tiers au plus, la moitié habituellement de l'élévation du taux des globulines. Avec des antigènes différents, Boyd et Bernard [88] trouvent que l'augmentation de l'anticorps est moindre que celle des

(*) On peut consulter à ce sujet la thèse de Tayeau [895]. Voir aussi [794, 557].

(**) Voir également la première partie du troisième chapitre de cette thèse.

globulines : il y a simplement parallélisme entre les éléments.

L'immunisation s'accompagne en effet de la production de protéines non spécifiques [828]. Cannon a étudié en détail l'aspect physiologique des réserves en protéines et de la fabrication d'anticorps [121] (*).

Dès 1891, Tizzoni et Cattani [921] montraient que les anticorps se trouvent dans la fraction globulinique du sérum. Ces résultats furent bientôt confirmés [856, 252, 253], puis précisés : l'anticorps se trouve tantôt dans les euglobulines, tantôt dans les pseudoglobulines [317, 355], parfois même réparti dans les deux fractions [41], selon l'animal immunisé [713], selon la période de l'immunisation [509] et selon l'antigène employé.

Les travaux précédents ont été effectués par relargage des protéines au moyen des sels neutres : les anticorps ainsi obtenus n'étaient pas absolument purs, et étaient accompagnés de protéines de solubilité voisine, mais dépourvues de toute activité anticorps.

Des résultats plus satisfaisants furent enregistrés par précipitation fractionnée au moyen de l'alcool, qui ne dénature pas les protéines lorsqu'on opère à température suffisamment basse. Felton [254] put ainsi éliminer la majeure partie des protéines inactives d'une préparation, tout en lui conservant son titre initial d'anticorps. Ces résultats furent vérifiés [627] et, tout récemment encore, E.-J. Cohn, avec cette même technique, a réussi à séparer du sérum humain les fractions anticorps à l'état très purifié [154].

D'autres auteurs [667, 273], à la suite du travail initial d'Aronson [26], essayèrent d'appliquer à l'isolement des anticorps les méthodes d'adsorption qui avaient été si fructueuses dans d'autres domaines.

Mais ce sont surtout les techniques de purification de l'anticorps par combinaison avec l'antigène homologue qui

(*) Tayeau et Pautrizel ont étudié le rôle des anémies, globulaire et plasmatique, dans la genèse des anticorps [900].

donnèrent les résultats les plus intéressants. Des déterminations chimiques avaient déjà montré que les précipités provenant des réactions antigène - anticorps contenaient beaucoup plus de protéines que l'antigène ne pouvait en rendre compte [964, 170].

Ramon ouvrit la voie à ces recherches en mélangeant au filtrat de culture du Bacille Diphtérique le sérum antitoxique correspondant. On obtient ainsi un précipité et, dans certaines conditions, le liquide surnageant ne contient plus d'anticorps; ce précipité, après lavage, est légèrement chauffé en milieu faiblement acide : il libère alors une antitoxine très purifiée [748].

Reprises par Sumner pour l'uréase [878], ces études prirent toute leur signification en 1932, quand Felton, travaillant avec un antigène polyosidique non azoté, réussit à isoler du complexe antigène-anticorps une euglobuline typique [255]. La nature globulinique des anticorps fut définitivement établie en 1936 par Heidelberger qui parvint à dissocier le floculat spécifique avec des réactifs aussi peu brutaux qu'une simple solution aqueuse de chlorure de sodium [378].

Mais c'est surtout ces dernières années que l'application de méthodes purement physiques à l'étude des antisérums a permis d'avoir des renseignements précis sur la constitution intime des anticorps.

C. — Données physicochimiques sur les anticorps

On a cherché tout d'abord à avoir des renseignements sur la dimension des molécules d'anticorps.

Les techniques d'ultrafiltration fractionnée, entre les mains d'Elford, de Grabar et de Fischer, ont assigné à la taille des anticorps la limite inférieure de 80 mμ [237]. La même année, Goodner et ses collaborateurs [314] montraient que, suivant l'animal immunisé, Cheval ou Lapin, les anticorps avaient des dimensions notablement différentes. De plus, pour un même anticorps, les dimensions

variaient avec certains facteurs, la dilution, par exemple : ce qui conduit à l'idée d'agrégats micellaires de particules élémentaires [965].

Il a fallu attendre la mise au point par Svedberg [882] de la technique d'ultracentrifugation pour acquérir des notions plus précises sur la molécule support de l'immunité. Tout d'abord, on a montré, dans le sérum normal, la présence d'une fraction albuminique et de trois fractions globuliniques, dont la principale correspondait à une masse moléculaire de 130.000 [883, 884, 634, 549, 552]. Puis on a constaté que, selon l'espèce animale (*), les anticorps étaient des globulines lourdes (Cheval, Vache, Porc) ou des globulines légères (Homme, Lapin, Singe) (tableau I).

TABLEAU I

Constantes de sédimentation et de diffusion, masses moléculaires et rapport des constantes de friction des anticorps antipolyosidiques des immunsérums antipneumococciques d'espèces animales différentes [447, 448].

Espèce	Constante de sédimentation $S_{20} \times 10^{13}$	Constante de diffusion $D_{20} \times 10^{7}$	Masse moléculaire M	f/fo
Porc	18,0	1,64	930.000	2,0
Vache	18,1	1,69	910.000	2,0
Cheval ...	17,9	1,63	930.000	2,0
	19,3	1,80	920.000	2,0
Lapin	7,0	4,23	157.000	1,4
	6,3	3,77	156.000	1,6
Singe	6,7	4,06	157.000	1,5
	7,2	3,50	196.000	1,6
Homme ..	7,4	3,60	195.000	1,5

Le poids moléculaire des anticorps humains est assez

(*) Voir [65, 380, 251, 708].

voisin de celui des globulines sériques normales; chez le Cheval au contraire, les globulines ont une masse moléculaire près de six fois plus grande dans l'immunsérum que dans le sérum ordinaire.

Cette technique d'ultra-centrifugation permet aussi, grâce à certains artifices [644], d'apprécier la forme des molécules. Neurath a calculé ainsi que l'anticorps antipneumococcique présentait, chez l'Homme, un rapport longueur/largeur de 9,2, ce même rapport étant de 7,5 pour l'anticorps analogue élaboré par le Lapin [436].

La migration des molécules protéidiques soumises à un champ électrique est connue depuis longtemps, et de nombreux auteurs ont voulu utiliser les différences de vitesses électrophorétiques pour identifier et séparer les divers constituants protéidiques d'un mélange complexe. Malgré les essais de Hardy [339], de Michaelis [607] et de Vlès [949] (*), ce n'est qu'avec le magnifique appareil de Tiselius [915] que l'on a pu avoir des renseignements précis sur le diagramme électrophorétique du sérum sanguin. Les sérums normaux comprennent quatre groupes de protéines de mobilité décroissante [916, 917] : l'albumine et trois globulines désignées par les lettres α, β, γ. Cette notion nouvelle fait table rase de la distinction longtemps classique entre pseudoglobulines et euglobulines. Tiselius et Kabat [920] ont montré que, chez le Lapin, les anticorps se retrouvent intégralement dans la fraction γ : cette globuline anticorps, de même masse moléculaire et de même vitesse électrophorétique que la γ globuline normale, accompagne cette dernière; dans le sérum des animaux immunisés, c'est la protéine spécifique qui forme la majeure partie de la fraction γ, fraction très augmentée par rapport à ce qu'elle est chez les animaux non immunisés. Si l'on commence par éliminer de l'antisérum l'anticorps qu'il contient, par précipitation spécifique au moyen de l'antigène, on constate, à

(*) Pour l'historique de la question, voir [558].

l'électrophorèse, que la fraction γ a presque entièrement disparu, tandis que les autres se montrent aussi abondantes qu'auparavant (fig. 1).

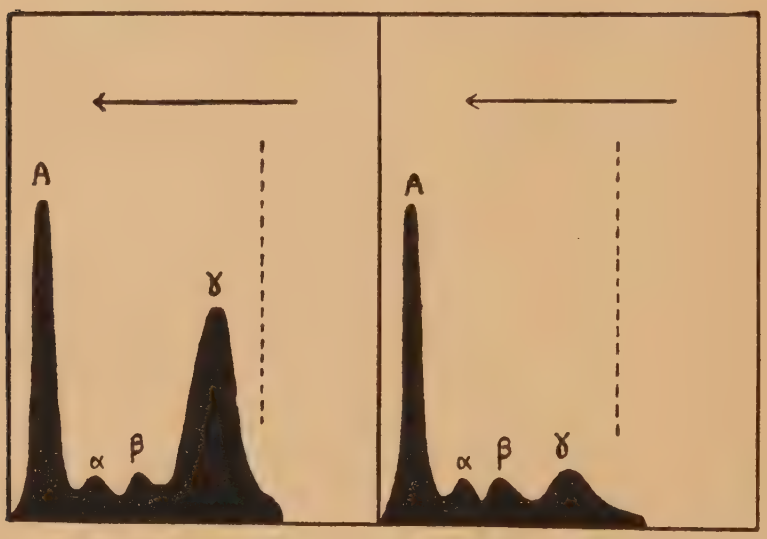


Fig. 1.

Diagramme électrophorétique d'un immunsérum de Lapin avant et après élimination de l'anticorps. En pointillé, position initiale des frontières. Les flèches donnent le sens de la migration. Les surfaces situées sous les différents accidents sont proportionnelles au taux des constituants. D'après Boyd [2].

Chez le Cheval, au contraire, c'est une quatrième fraction globulinique, cheminant entre les fractions normales β et γ, qui renferme l'anticorps [457] : ce constituant, absent des sérums normaux, a une masse moléculaire beaucoup plus élevée que celle des globulines normales (*).

Il est donc bien établi, à l'heure actuelle, que les anticorps sont des protéides, le plus souvent des γ globulines. Lorsqu'on isole et qu'on purifie au maximum les anticorps, on constate qu'ils renferment toujours une quantité de lipides

(*) Pour plus de détails sur l'étude électrophorétique des anticorps, voir [918, 153, 548].

non négligeable. En fait, comme nous le verrons plus loin (*), ces graisses n'ont, par elles-mêmes, aucune activité spécifique et ne jouent qu'un rôle purement physique, en modifiant la solubilité des éléments protéidiques. On trouve aussi, associées aux anticorps, des traces de glucides, mais ces substances réductrices existent toujours, même dans les fractions protéiniques les plus purifiées. Il est intéressant de signaler que ces glucides n'affectent d'ailleurs en rien la spécificité de ces protéides [642].

Des analyses chimiques ont d'ailleurs permis de constater que les anticorps purifiés, aussi bien que les précipités spécifiques obtenus avec des antigènes non azotés, ont des teneurs en azote total, en acides aminés, en azote amidé, voisines, sinon identiques à celles des globulines normales [40, 99, 255, 941, 395, 147, 115, 116]. Leurs spectres d'absorption sont identiques [857, 157]. On constate simplement quelques différences dans les points isoélectriques (**) (tableau II, voir p. 40).

Il existe encore d'autres petites différences : Lecomte du Noüy a montré que la tension superficielle statique du sérum était un peu plus faible chez l'animal immunisé que chez l'animal normal [503, 505]. Ce phénomène a été le premier test physique de l'immunité. Signalons que cette diminution de tension n'est absolument pas spécifique, ce qui réduit beaucoup sa portée pratique.

Si les anticorps sont donc bien des globulines très voisines des globulines normales, une question se pose cependant : est-ce l'ensemble de la grosse molécule qui est responsable des propriétés physiques ou, au contraire, celles-ci sont-elles localisées ?

Le problème doit être considéré sous un jour nouveau depuis l'obtention toute récente des anticorps à l'état cris-

---

(*) Troisième partie, deuxième chapitre.

(**) Le point isoélectrique des globulines anticorps est le même, que l'immunisation ait été réalisée au moyen d'un antigène fortement acide ou basique [355].

TABLEAU II

Points isoélectriques de diverses protéines normales et de divers anticorps. D'après Sevag [857].

	PROTÉINE	*p*H Isoélectrique
1.	Sérum-globuline de Cheval normale (non fractionnée)	5,20
2.	Sérum-globuline de Lapin normale (non fractionnée)	5,26
3.	Anticorps antipneumococcique de Cheval isolé par les méthodes aux sels..	4,40
4.	Anticorps antipneumococcique de Vache isolé par les méthodes aux sels..	4,80
5.	Anticorps antipneumococcique de Porc isolé par les méthodes aux sels....	5,10
6.	γ globuline de Lapin	5,86
7.	Anticorps anti-ovalbumine de Lapin isolé par électrophorèse	5,80

tallisé. Combinant l'action ménagée des enzymes protéolytiques à la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, Northrop [659], à partir du sérum antidiphtérique de Cheval, a isolé une fraction riche en antitoxine (un million d'unités antitoxiques par gramme), presque entièrement précipitable par la toxine, homogène à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse, dont la masse moléculaire n'est que de 90.000 [801]. Nous sommes loin de la globuline anticorps native, dont le poids moléculaire est dix fois supérieur, et même de la globuline normale. Petermann [707] a obtenu, chez l'Homme, par des traitements analogues, des substances protéidiques douées de fortes propriétés anticorps, et dont le poids moléculaire était inférieur

à 50.000. Les propriétés spécifiques sont donc localisées dans la molécule globulinique, et une digestion enzymatique bien conduite peut scinder la molécule en fragments, dont certains possèdent toute l'activité anticorps initiale.

Nous voyons donc, pour conclure, que si la constitution chimique des anticorps est loin d'être élucidée, ces substances ne sont plus les « phénoménines » du début de l'immunologie : ce sont des globulines ou des fragments de globulines.

Les données concernant le lieu, et surtout le mécanisme de formation des anticorps, sont, au contraire, encore bien hypothétiques. Nous allons les passer en revue.

II. — LIEU DE FORMATION DES ANTICORPS

Quelques jours après l'injection d'un antigène, on peut discerner des propriétés anticorps, non seulement dans le sérum de l'animal soumis à l'immunisation, mais encore dans la lymphe, l'œdème circulatoire ou inflammatoire, etc. Si l'on injecte, d'autre part, un anticorps préformé dans le torrent circulatoire d'un individu, on voit bientôt cet anticorps se répartir uniformément dans l'organisme.

On peut donc penser que les anticorps sont élaborés dans le sang circulant : en réalité, si l'on saigne à blanc un animal quelques heures après lui avoir injecté un antigène par voie intraveineuse, et qu'on injecte le sang ainsi recueilli à un animal neuf, on ne peut susciter chez ce deuxième animal la formation d'anticorps vis-à-vis de l'antigène initial. L'animal saigné, au contraire, transfusé de sang frais, fabrique ses anticorps tout à fait normalement (*).

Il est assez légitime d'attribuer aux organes responsables de la phagocytose l'élaboration des anticorps. Dès 1898, Pfeiffer et Marx [711], inoculant au Lapin des vibrions

(*) La production des anticorps a été bien étudiée du point de vue physiologique par Sédallian [852], dans le cas particulier de l'antitoxine diphtérique. Consulter également Pautrizel (R.) : Recherches sur la genèse et la réactivité des anticorps. Thèse Doct. Sciences, Bordeaux, 1948.

cholériques tués, constatent que la sensibilisatrice apparaît plus précocement dans la rate, la moelle osseuse ou les ganglions lymphatiques abdominaux que dans le sang. De nombreux exemples analogues ont été apportés par la suite [958, 192, 132, 924].

Certains auteurs ont pensé à la possibilité d'une production locale d'anticorps [218, 471, 957, 124, 628, 629]. Les cellules productrices seraient disséminées dans tout l'organisme, mais l'anticorps apparaîtrait tout d'abord au voisinage de la région où l'antigène a été introduit. Il diffuserait par la suite. Les expériences ont d'ailleurs été partiellement infirmées [384, 853, 763, 640].

La méthode de culture des tissus, entre les mains de Carrel [126], puis de Ludke [547], Reiter [786], Przygode [743], a permis de constater la formation d'anticorps *in vitro*, à partir de différents organes (rate, moelle osseuse, ganglions).

La richesse de ces différents organes en éléments phagocytaires a attiré l'attention sur le rôle possible du système réticulo-endothélial dans l'immunité humorale. La production d'anticorps est entravée par l'injection intraveineuse de particules inertes ou de colorants colloïdaux qui bloquent le S. R. E.; ces expériences ne sont d'ailleurs pas très démonstratives, car parfois l'injection de ces substances excite au contraire la capacité phagocytaire des macrophages.

Le rôle du S. R. E. semblait définitivement établi par les recherches de Sabin [811]. Cet auteur a étudié les réactions histophysiologiques consécutives à l'injection de certaines azoprotéines très fortement colorées : ces dérivés sont fixés par les cellules réticulo-endothéliales, au sein desquelles on les reconnaît facilement. A un moment donné, il se produit une « exfoliation » de la partie périphérique du cytoplasma, et les pellicules ainsi détachées viennent se dissoudre dans le milieu ambiant : ce phénomène coïncide justement avec l'apparition des anticorps dans les humeurs,

Ranvier avait signalé jadis l'aspect effiloché de l'exoplasme des macrophages, d'où le nom de « clasmatocytes » qu'il leur avait attribué.

Les travaux des Anglo-Saxons, pendant la dernière guerre, ont jeté une nouvelle lumière sur le lieu de l'élaboration des anticorps (*) : avec les recherches de White [203, 968], de Kass [452], de Harris [230], de Gara [291], l'attention se trouve attirée sur le tissu lymphoïde et plus spécialement les lymphocytes comme lieu de formation des globulines normales et des anticorps, comme le supposait Mc Master [574]. On a montré que le suc des lymphocytes était très riche en γ globuline chez le sujet normal [452] et en anticorps chez l'individu immun. La sécrétion des anticorps dans le milieu humoral se ferait par voie hormonale : devant toute sollicitation extérieure, le sujet répondrait par une libération importante d'adrénaline (réaction de Selye [855]). Cette hormone viendrait exciter l'hypophyse antérieure qui déclencherait au niveau de la surrénale une sécrétion d'hormones stéroïdes oxygénées en C_{11}; ces dernières se fixent directement sur les lymphocytes et, provoquant leur lyse, libèrent les anticorps (**). On s'explique ainsi la réaction « anamnestique » : un sujet, immunisé vis-à-vis d'un antigène A, voit le taux de ses anticorps homologues augmenter sous l'influence de l'injection d'un antigène B, cependant complètement différent du premier. Cette injection aurait déclenché le mécanisme de libération des anticorps préexistants.

Cette nouvelle voie de recherches s'avère donc très féconde; de nombreux points, cependant, demeurent encore obscurs : les lymphocytes, contrairement aux polynucléaires et aux macrophages, n'ont ni pouvoir phagocytaire, ni

(*) On consultera avec fruit une revue récente de Boivin et Delaunay [74].

(**) Un stimulus nerveux pourrait être le départ de cette cascade de réactions, On peut interpréter dans ce sens les fameuses expériences de Metalnikov [605] sur l'interférence des réflexes conditionnels dans les phénomènes immunitaires.

pouvoir colloïdopexique. Il est possible que, dès sa pénétration dans l'organisme, l'antigène, surtout si c'est un élément figuré, soit d'abord capté par les cellules du S. R. E.; les lymphocytes interviendraient seulement par la suite, pour fabriquer les anticorps. Les recherches sont en cours sur ce sujet.

III. — MÉCANISME DE FORMATION DES ANTICORPS

L'élaboration de l'anticorps par les organismes est un des plus curieux phénomènes de la biologie; la haute spécificité de la réaction a vivement intéressé les chercheurs, qui ont proposé maintes théories pour l'expliquer.

Avant de passer en revue ces hypothèses, nous voulons rappeler un fait important, la possibilité d'engendrer plusieurs anticorps par injection d'un même antigène.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'injection d'une azoprotéine provoquait l'apparition d'anticorps; ceux-ci peuvent quelquefois se combiner et donner des précipités non seulement avec l'azoprotéine originelle, mais encore avec des antigènes voisins.

Y a-t-il, dans l'immunsérum, un seul type d'anticorps, de spécificité plus ou moins large, ou, au contraire, plusieurs anticorps d'affinité différente ?

La question a pu être tranchée en employant la méthode d' « adsorption des anticorps » (Landsteiner), dont nous allons donner maintenant un exemple. Préparons un animal avec une azoprotéine renfermant de l'acide méta-aminobenzène-sulfonique. L'immunsérum manifeste, vis-à-vis d'azoprotéines voisines, les affinités suivantes :

	Ortho.	Méta.	Para.
Azoprotéine à base d'acide aminobenzène sulfonique..	+	+ +	+
— — — benzoïque	0	+	+
— — — benzène arsénique..	0	+	+

Portons maintenant ce sérum au contact d'une azoprotéine insoluble (*) à base d'acide méta-aminobenzène-sulfonique. Après un certain temps, on élimine la protéine insoluble : le sérum restant n'a plus de propriétés précipitantes vis-à-vis des autres azoprotéines solubles. Si nous recommençons l'expérience en adsorbant le sérum avec une azoprotéine insoluble à base d'acide ortho-aminobenzène-sulfonique, le sérum ne précipitera plus ce dernier type d'antigène, mais réagira encore avec les azoprotéines solubles dérivant de l'acide méta-aminobenzène-sulfonique, de l'acide méta-aminobenzoïque et de l'acide méta-aminobenzène-arsénique. De même, le sérum initial, adsorbé par une azoprotéine insoluble à base d'acide méta-aminobenzoïque, précipitera les azoprotéides porteurs des trois acides méta-aminosulfonique, ortho-aminosulfonique et méta-aminoarsénique, mais non celles dérivant de l'acide méta-aminobenzoïque.

Nous sommes donc conduit à admettre la présence, dans le sérum, de plusieurs anticorps distincts, de spécificité légèrement différente. Chacun de ces anticorps est étroitement adapté à un « motif » de l'antigène.

Voyons maintenant comment peut se faire cette adaptation.

Nous ne ferons que rappeler la vieille théorie d'Ehrlich [232] : pour cet auteur, les anticorps sont des constituants cellulaires normaux, ce sont des « récepteurs » fixant l'antigène à son arrivée dans le cytoplasme. La cellule tend à reprendre sa composition normale et à reformer le récepteur auquel l'antigène s'est uni. Mais ce processus salutaire, trop énergique, dépasse le but visé : les récepteurs de nouvelle formation encombrent la cellule qui, pour s'en débarrasser, en déverse l'excès dans les humeurs. Les objections

---

(*) Il est indispensable d'opérer sur des protéines insolubles, afin de pouvoir ensuite les éliminer facilement par centrifugation. Cette protéine insoluble, généralement des stroma d'hématies, joue le rôle des éléments figurés dans l'épreuve de la saturation des agglutinines (Castellani [132]).

sont nombreuses contre cette théorie purement spéculative. Un haptène, bien qu'il puisse bloquer ce récepteur, ne possède pas de propriétés antigéniques; les cellules du système nerveux, qui adsorbent électivement certaines toxines, ne sécrètent pas pour autant d'anticorps.

Au début de l'ère immunologique, on a supposé pendant longtemps que l'antigène était englobé dans la molécule d'anticorps. Cette théorie est inadmissible, si l'on songe à la disproportion flagrante entre le nombre considérable de molécules d'anticorps et la faible quantité d'antigène nécessaire à l'immunisation. On n'a jamais pu retrouver d'ailleurs dans l'anticorps certains éléments présents dans l'antigène et facilement identifiables. Injectant à l'animal un azoprotéide à base d'atoxyl, Doerr et Friedli [200], ainsi que plusieurs autres chercheurs [54, 406, 346, 980, 349, 350], n'ont pu déceler dans l'anticorps la moindre trace d'arsenic. Bien plus, on constate que l'animal élimine progressivement ce métalloïde, alors que la production d'anticorps n'en continue pas moins.

La première théorie vraiment fructueuse, basée sur des faits expérimentaux, a été celle de Breinl et Haurowitz [99]. Ces auteurs pensent que les cellules qui font la synthèse de la sérum-globuline possèdent des surfaces spécifiques, où les résidus d'acides aminés appartenant aux protéines cellulaires sont groupés d'une manière caractéristique pour l'espèce animale envisagée. En l'absence d'antigène, les nouveaux aminoacides, qui au contact de cette surface vont s'unir pour former la chaîne peptidique de la globuline en voie de synthèse, ne pourront se ranger dans n'importe quel ordre. Chaque groupement présent sur cette surface attirera ou, au contraire, repoussera tel ou tel groupement des acides aminés qui se présentent au voisinage de la cellule. Par exemple, une fonction — COOH aura tendance à capter le pôle aminé d'un monoacide diaminé, une chaîne polyméthylénique d'un résidu d'aminoacide aliphatique va s'unir à une chaîne analogue par solvatation réci-

proque (*). De plus, la disposition spatiale de ces divers groupements amènera des empêchements stériques et facilitera au contraire tel ou tel arrangement moléculaire. La globuline normale ainsi formée aura donc une structure bien déterminée.

Si un antigène est adsorbé sur cette surface, il va en modifier considérablement la structure, masquant certaines fonctions, apportant lui-même de nouveaux groupements. L'orientation des aminoacides dans la synthèse de la globuline anticorps sera ainsi dirigée, non plus par la surface spécifique de la cellule, comme pour la globuline normale, mais par les valences de surface du complexe cellule-antigène.

La globuline anticorps ainsi élaborée sera légèrement différente des globulines normales; elle possédera dans son architecture un certain « souvenir » de l'antigène, une surface où l'orientation des fonctions et des valences sera telle qu'elle aura une grande affinité à s'unir à celui-ci. Les antigènes contenant des groupements polaires possédant une valence résiduelle (— COOH, — SO_3H, — NH_2) seront beaucoup plus aptes à modifier la structure de la nouvelle globuline que ceux contenant seulement des chaînes aliphatiques ou des cycles aromatiques apolaires.

Cette théorie a été reprise sans grands changements par Mudd [624], puis par Alexander [18]; en France, elle a été soutenue par Machebœuf et Faure [563].

Le rôle de ces actions de surface dans la production des anticorps est bien démontré dans les expériences suivantes : l'injection à un animal d'un complexe antigène-anticorps, où la surface de l'antigène est masquée par l'anticorps, ne rend pas cet animal immun vis-à-vis de l'antigène [323], mais peut déclencher l'élaboration d'anti-anticorps [20, 343, 588].

(*) Nous aurons l'occasion (deuxième partie, second chapitre) de revenir sur la nature de ces différentes forces d'attraction.

Tout récemment encore, cette conception de l'empreinte de l'antigène sur l'anticorps a été modifiée par Machebœuf [560]. Se basant sur les travaux de Caspersson et de son école [128, 131], et sur ceux de Grégoire [328, 329], cet auteur suppose que les acides nucléiques cytoplasmiques jouent un rôle prépondérant dans la synthèse des anticorps. Le cytoplasme des cellules phagocytaires est riche en acides ribonucléiques disposés en longues chaînes formées de nucléotides juxtaposés. C'est le long de ces chaînes que se disposeraient les acides aminés dont l'union va créer la chaîne peptidique fondamentale des protéines. Au cours de l'immunisation, les chaînes d'acides nucléiques sont soumises, par les différents groupements de l'antigène, à des attractions en certains endroits, à des répulsions en d'autres. Ces chaînes sont donc déformées et vont reproduire, du côté opposé à celui où se trouve l'antigène, le contour extérieur de ce dernier (*).

Les protéines synthétisées à cet endroit présenteront donc un motif constituant une empreinte négative de l'antigène : elles seront donc particulièrement adaptées à se combiner avec lui.

Ces diverses théories du *moulage* de l'anticorps sur l'antigène, moulage effectué pendant la synthèse de la protéine, à partir de ses maillons fondamentaux, implique une composition, ou simplement un ordre différent des aminoacides dans la chaîne peptidique de la globuline normale et dans la globuline anticorps. D'autre part, nous savons qu'en réalité, les molécules globuliniques ne se présentent pas à l'état natif sous cet aspect fibrillaire mais, au contraire, sous une forme remaniée, globulaire, créée par des attractions entre les différents résidus d'aminoacides,

(*) Machebœuf propose une comparaison très imagée avec une échelle de corde à barreaux posée sur un plan, cette échelle représentant la chaîne d'acides nucléiques. En présence d'un contour étranger appliqué contre le bord de l'échelle, les barreaux de bois vont se déplacer en restant parallèles à eux-mêmes, et le bord opposé de l'échelle va évidemment reproduire la forme du corps étranger accolé à celle-ci.

amenant des repliements de la chaîne peptidique fondamentale.

C'est pourquoi, en 1940, Pauling [685], reprenant les idées de Rothen et Landsteiner [806], a proposé une nouvelle hypothèse. Cet auteur ne croit pas que l'antigène, lorsqu'il détermine la structure d'une molécule d'anticorps, groupe les résidus d'aminoacides dans un ordre différent de celui des chaînes peptidiques des globulines normales : l'anticorps et la globuline normale ne diffèrent que dans la manière dont leurs chaînes peptidiques sont repliées, que dans leur « structure secondaire ». Le nombre de configurations possibles des chaînes est si grand, qu'il suffit à expliquer la possibilité que possède l'animal d'élaborer des anticorps strictement spécifiques pour un nombre apparemment illimité d'antigènes différents. Des considérations thermodynamiques conduisent Pauling à admettre que l'arrangement des résidus d'aminoacides dans la partie centrale de la molécule est très stable, tandis qu'au contraire les extrémités des chaînes peptidiques peuvent présenter des configurations très variées qui ne s'accompagnent pas de grandes modifications de l'énergie interne. La partie centrale ne différerait pas de celle d'une globuline normale, et serait responsable du caractère antigénique de la molécule, c'est-à-dire de sa spécificité zoologique : les anticorps, injectés comme antigènes, donnent naissance à des précipitines qui réagissent également avec des globulines normales.

Pauling a illustré cette théorie par la réalisation d'anticorps *in vitro* [689, 690, 682]. Il met en contact une solution de globulines normales et un colorant de poids moléculaire élevé, comme le bleu de méthyle, par exemple; par addition très progressive de soude diluée, il amène lentement le *p*H du milieu aux environs de *p*H 11. Quelques jours après, il revient très doucement à la neutralité. Dans ces conditions, la globuline a acquis une affinité spécifique pour le colorant et devient susceptible de donner avec lui des complexes insolubles. Pauling pense que, sous l'influence de

la légère dénaturation entraînée par l'alcalinité du milieu, la chaîne peptidique se déplisse et prend une forme rectiligne. Lors du retour à la neutralité, elle récupère sa « structure secondaire », mais celle-ci est maintenant influencée par la présence de la molécule de colorant. Ici encore, la nouvelle structure refléterait l'empreinte négative de l'antigène. Ces résultats pouvaient cependant être interprétés différemment depuis que Dean [169] a montré qu'un colorant très voisin de celui utilisé par Pauling, donne un précipité avec le sérum de Cheval normal.

De nouvelles expériences furent donc effectuées avec comme antigène non plus un colorant, mais un polyoside pneumococcique; le chauffage modéré était utilisé comme agent dénaturant. Les résultats furent identiques. Il n'est d'ailleurs pas encore définitivement établi que les substances préparées artificiellement par Pauling soient de véritables anticorps : l'étude critique et quantitative de leur comportement [446] montre des différences importantes par rapport aux anticorps naturels.

Pas très éloigné de la conception de Pauling est le mécanisme de formation des anticorps que nous suggère encore Machebœuf [566]. La molécule de protéine globulaire, selon Bressler et Talmud [101], consiste en une sorte de spirale ou d'hélice formée par la chaîne peptidique élémentaire. Toutes les fonctions polaires hydrophiles de la molécule sont dirigées vers le milieu aqueux extérieur, tandis que les groupements hydrophobes, dirigés vers l'axe de l'hélice, s'attirent mutuellement. Cette conception, reposant elle aussi sur des considérations thermodynamiques, s'est déjà révélée très féconde dans ses applications : elle a permis en particulier de prévoir la valeur de la masse moléculaire de polymères synthétiques, résultats qui ont ensuite été entièrement confirmés par l'expérience [102].

Du point de vue immunologique, elle permet de supposer que la structure primaire d'une globuline, normale ou anticorps, est faite de la même chaîne peptidique. L'apparition

des propriétés spécifiques se ferait, comme dans la théorie de Pauling, au moment où la molécule acquiert sa structure secondaire hélicoïdale. En présence d'un antigène, certains résidus d'aminoacides seraient fixés dans une configuration spatiale bien déterminée, dépendant de la structure même de l'antigène. Le restant de la chaîne peptidique prendrait sa forme habituelle.

Toutes les globulines sériques sont-elles également aptes à être transformées en anticorps ? Sandor et Pérez [826] ont émis récemment l'hypothèse que seules certaines fractions globuliniques, présentes dans tous les sérums normaux, les « pro-anticorps », seraient susceptibles d'acquérir les groupements fixateurs spécifiques.

Les diverses théories sur le mécanisme de la formation des anticorps concordent toutes pour admettre qu'il existe, dans une partie de la molécule, une disposition d'atomes placés de telle manière qu'ils correspondent à des groupements présentant la même configuration sur la surface de l'antigène. C'est par l'union de ces « motifs spécifiques », si étroitement adaptés l'un à l'autre, que va s'effectuer la réaction antigène-anticorps.

Cette adaptation spécifique de l'anticorps à l'antigène se fait d'ailleurs progressivement au cours de l'immunisation. Dès la première injection préparante, il apparaît une modification sérique : cette modification n'entraîne pas encore l'existence d'un pouvoir floculant (*) et on ne peut la mettre en évidence que par des artifices : étude de la viscosité [539] ou inhibition d'une réaction de floculation normale [372, 374, 382, 515]. Cette inhibition est due à l'union de l'anticorps encore incomplet avec l'antigène, entravant l'action d'un antisérum homologue [543]. Cependant, des travaux récents de Lourau tendent à prouver que la subs-

(*) Dans certains cas, cependant, Ramon [760] a pu mettre en évidence des anticorps floculants dès la sixième heure après une injection unique d'antigène (filtrat de culture de Bacille Pesteux).

tance inhibante n'est pas spécifique [545] (*). Les injections ultérieures perfectionnent cette modification sérique initiale, transformant les globulines en précipitines véritables. Lorsqu'on prolonge l'immunisation, l'affinité de l'anticorps pour l'antigène devient de plus en plus nette [382], se traduisant par un élargissement de la zone d'équivalence (voir p. 82).

Une autre question, étroitement apparentée au mode de formation des anticorps, se pose encore : la molécule d'anticorps, dont l'originalité réside en l'existence d'un assemblage de groupements spécifiques, contient-elle un ou plusieurs de ces motifs ? C'est le problème de la « valence » des anticorps.

On dit parfois d'un sérum thérapeutique qu'il est polyvalent, en ce sens qu'il contient plusieurs anticorps pour plusieurs antigènes différents. Mais ces anticorps sont entièrement distincts.

La valence dont nous voulons parler, c'est le nombre de groupements spécifiques par molécule d'anticorps. Il semble que la question ne soit pas encore entièrement résolue. Certains auteurs (Marrack [5, 862], Pauling [685]) estiment que les anticorps sont polyvalents, ayant au minimum deux groupements réactionnels par molécule. C'est ainsi que l'étude du système toxine-antitoxine diphtérique, à l'aide de l'ultracentrifugation, montre que la molécule d'antitoxine peut se combiner à deux molécules de toxine et serait donc divalente [681]. Au contraire, Boyd [414, 2] et, tout récemment encore, Haurowitz et Schwerin [353, 354] n'ont pu mettre en évidence que des anticorps univalents. Ces derniers auteurs, par exemple, étudiant l'antisérum précipitant une globuline de Mouton contenant de l'acide arsanilique, montrent que la même molécule d'anticorps ne contient

(*) Une substance analogue, inhibitrice et non spécifique, existerait dans les sérums vieillis, résultant de la dégradation aseptique spontanée des anticorps [544]. Signalons encore que Dognon [352] a pu extraire des antisérums hémolytiques, par moussage, une substance inhibant partiellement l'hémolyse.

jamais de groupements réactionnels à la fois pour le haptène arsanilique et pour la protéine de Mouton.

Des expériences d'adsorption plaideraient dans le même sens; l'antitoxine diphtérique, adsorbée sur collodion [280] ou sur charbon de bois [234], ne peut plus neutraliser la toxine : le groupement antitoxique spécifique unique serait donc englobé dans la liaison avec les particules de charbon ou de collodion.

Remarquons toutefois que dans une immunglobuline, la surface de combinaison agissant comme anticorps est différente de celle qui détermine le caractère antigénique propre de cette molécule protéidique. Eisler [235] a montré que l'antitoxine est encore floculable par une précipitine correspondante, alors qu'elle est liée à la toxine. De même, l'antitoxine diphtérique de Cheval, soumise à un immunsérum anti-Cheval, réagit encore avec la toxine microbienne.

Les diverses hypothèses que nous venons d'exposer sur la formation des anticorps ne nous permettent cependant pas d'expliquer la manière dont on peut concevoir, une fois l'anticorps formé *in vivo*, sa libération du complexe formateur cellule-antigène. Machebœuf, Viscontini et Raynaud [570] ont pensé que les nouveaux aminoacides, arrivant au voisinage de la cellule pour synthétiser les nouvelles globulines, pouvaient agir par action de masse et mettre en liberté l'anticorps formé. Leurs essais, *in vitro*, n'ont pas justifié cette hypothèse. Cependant, Euler et Brunius [246] avaient constaté la dissociation d'un complexe hématies-hémolysine sous l'influence de solutions assez concentrées de glycocolle. Landsteiner et Raubitschek [363] avaient obtenu jadis des résultats analogues avec la peptone.

Il serait fort intéressant de poursuivre ces expériences et d'essayer de dissocier les complexes antigènes-anticorps par différents stéroïdes, depuis que le rôle de ces dérivés a été mis en évidence dans la libération des anticorps dans le milieu circulant.

De nombreuses autres questions restent encore fort

obscures. Nous avons cité plus haut les expériences d'Haurowitz qui constatait, malgré la disparition rapide de l'organisme de l'arsenic antigénique, que les anticorps correspondant persistent encore longtemps dans l'organisme. Or, les techniques nouvelles d'utilisation des éléments marqués ont permis de montrer que la vie d'une molécule d'anticorps dans l'organisme est très restreinte, de l'ordre d'une quinzaine de jours [847, 383]. Il se fabrique donc continuellement de nouvelles globulines anticorps. Quel est alors leur mécanisme de formation, puisque l'antigène est éliminé de l'organisme ? Quel élément façonne le motif spécifique des nouveaux anticorps ?

C'est devant ces difficultés que Sandor a proposé tout récemment une nouvelle conception [821]. Il admet que l'antigène s'adsorbe sur une cellule sensible de l'organisme. Par sa présence, il modifie la synthèse protéidique de la cellule. Cette cellule — profondément perturbée dans son anabolisme et son catabolisme, voire même dans sa morphologie — entre dans un nouvel état métabolique. A ce nouvel état métabolique, compatible avec la présence de l'antigène, correspondra un nouveau protéide de synthèse dont les caractères physicochimiques modifiés porteront l'empreinte du changement métabolique et nullement celle de l'antigène seulement. Cette théorie nous fait cependant moins bien apercevoir le mécanisme de formation de la spécificité des anticorps.

CONCLUSIONS

Si la nature des anticorps commence à être assez bien connue, les hypothèses sur leur mécanisme de formation sont encore en réalité bien fragiles. C'est que la biochimie dynamique cellulaire est encore à ses débuts. On est en droit d'attendre beaucoup, au point de vue immunologique, des très nombreux travaux en cours à l'heure actuelle un peu partout dans le Monde pour pénétrer la structure intime des protéines et leur mode de formation dans l'organisme.

DEUXIÈME PARTIE

LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE

ÉTUDE THÉORIQUE

CHAPITRE PREMIER

RAPPEL HISTORIQUE. — GÉNÉRALITÉS

Nous avons déjà signalé que c'est Rudolf Kraus [468, 469] qui constata le premier le phénomène de précipitation spécifique. Le 30 avril 1897, à la session de la « K. K. Gesellschaft der Aertze » de Vienne, ce bactériologiste rapportait les faits suivants : on cultive en milieu liquide divers microbes (bacilles cholériques, typhiques et pesteux). Les cultures sont soigneusement filtrées et on vérifie que le filtrat, bien limpide, ne contient ni germes, ni cellules. On lui ajoute une certaine quantité de l'immunsérum correspondant et on maintient le mélange à 37° C. : on voit apparaître, assez lentement, une opalescence qui va en augmentant progressivement et qui se résoud finalement en petits flocons. Ces flocons se rassemblent bientôt au fond du tube, surmontés d'un liquide parfaitement limpide. On n'obtient dans les mêmes conditions aucun précipité avec un immunsérum non homologue. Kraus avait déjà noté la grande spécificité de cette réaction de floculation.

Dès l'année suivante, on reconnaissait la grande généralité de ce phénomène dans le domaine microbien : Nicolle [651], Wladimiroff [978], Norris [657] constatèrent des faits absolument identiques avec les filtrats de très nombreux germes : B. Coli, Bacilles morveux et pyocyanique, Prodigiosus.

En 1899, Bordet put constater des précipitations spécifi-

ques avec des produits non bactériens [80]. Travaillant sur les sérums hémolytiques dont il venait de découvrir les propriétés, il observe que par exemple, le sérum de Lapin immunisé par le sang de Poule trouble le sérum de Poule; réciproquement, le sérum de Poule immunisée vis-à-vis du sang de Lapin trouble le sérum de ce dernier animal.

Quelques mois plus tard, Tchistovitch [908] confirma ces résultats : cet auteur étudiait le sérum d'Anguille, sérum doué de propriétés fortement toxiques. Inoculant ce produit à des Lapins, il constata que bientôt leur sérum, mélangé au sérum toxique de l'Anguille, produisait une opalescence très forte, se condensant rapidement en flocons.

Ainsi étaient mises en évidence des précipitines spécifiques vis-à-vis de substances d'origine animale. Les réactions de floculation observées étaient plus rapides et encore plus nettes que celles que Kraus avait effectuées au moyen de produits bactériens. La découverte des phytoprécipitines, en 1900 [439], montrait que ces réactions immunologiques pouvaient être provoquées par les substances des deux règnes.

En 1901, Uhlenhuth [932] décrivait une nouvelle technique d'observation de la précipitation spécifique, plus sensible que la précédente : la « réaction de l'anneau », terme assez improprement choisi d'ailleurs. On verse dans un tube en verre, de petit calibre, quelques dixièmes de centimètre cube de l'immunsérum étudié et l'on fait couler, le long de la paroi interne du tube, le même volume de solution de l'antigène correspondant, en évitant de mélanger les deux liquides. On observe, à l'interface, un disque de précipité blanchâtre (et non un anneau). Cette technique tire ses avantages de sa très grande sensibilité. Elle a, par la suite, été souvent employée [268, 337, 24].

Pendant assez longtemps, les réactions de précipitation restèrent uniquement qualitatives. Leurs applications furent surtout orientées dans un but diagnostique : Miessner et Pfeiffer [612], par exemple, utilisèrent ce procédé pour

reconnaître les Chevaux atteints de morve; on savait, en effet, que le sérum des Chevaux morveux précipite spécifiquement les filtrats de culture de ce Bacille [171, 978]. Mais c'est surtout Ascoli [30] qui montra tout le parti qu'on pouvait tirer de la réaction de précipitation spécifique pour le diagnostic de plusieurs maladies infectieuses, en particulier du Charbon. Les animaux morts de cette septicémie possèdent dans tous leurs tissus, et spécialement dans leur rate, un antigène provenant du germe microbien; le suc splénique de ces animaux précipite abondamment en présence du sérum d'animaux vaccinés contre le Charbon.

Les applications médico-légales de la floculation entre antigène et anticorps (identification de taches de sang suspectes, recherches des fraudes dans l'industrie alimentaire, etc.) étaient aussi purement qualitatives.

Tout au moins, les méthodes quantitatives en usage à cette époque n'étaient que comparatives. Le procédé généralement employé pour mesurer la force d'un antisérum consistait à déterminer la plus grande dilution d'antigène donnant encore un précipité visible. Nous verrons plus loin (p. 79), en étudiant le phénomène de zone, les inconvénients d'une telle pratique. Notons cependant que Martin [593], tout récemment, a encore proposé une méthode de dilution limite pour titrer quantitativement les précipitines d'un système floculant : mais cet auteur dilue le sérum à titrer, et non l'antigène.

Malgré quelques travaux antérieurs [653], il faut reconnaître que c'est Ramon [745, 747] qui montra le premier les possibilités de dosages précis et d'évaluations quantitatives de la réaction de précipitation : étudiant la floculation de la toxine diphtérique par le sérum antidiphtérique de Cheval, Ramon constata que, dans certaines conditions de technique, on pouvait déterminer très rapidement le titre antitoxique d'un immunsérum. La méthode d'Ehrlich, qu'on employait exclusivement jusqu'alors, nécessitait une grande quantité d'animaux, était délicate et surtout beaucoup plus longue,

La technique de Ramon permettait en outre la mesure *in vitro* de la valeur antigène et immunisante de la toxine [749] (*).

Ces méthodes de floculation ont donné un essor considérable à l'immunologie : étude des toxines, de la toxigénèse, des antitoxines, du mécanisme de leur combinaison, etc. (**). Elles ont rendu et rendent encore chaque jour les plus grands services dans le travail ordinaire des Instituts sérothérapiques. Cependant, elles ne peuvent s'appliquer à tous les systèmes précipitants. Même employées dans les meilleures conditions (toxine-antitoxine diphtérique), elles reposent en définitive sur une unité biologique plus ou moins constante, la dose mortelle. Cette unité est susceptible d'assez grandes fluctuations pour les différents individus d'une espèce donnée. La précision des dosages s'en ressent d'autant.

Aussi, les chercheurs qui étudiaient les réactions de précipitation antigène-anticorps sous un jour plus théorique, recherchèrent bientôt des procédés de mesure plus précis et surtout plus absolus. On peut dire, avec Heidelberger [360], que « *immunology and the early immunochemistry as well, staggered under the dictatorship of dilution, and the tyranny of titer* ».

Quelques tentatives furent faites pour évaluer pondéralement le complexe antigène-anticorps formé. Celui-ci pouvant adsorber différentes substances non spécifiques, la précision obtenue n'était que toute relative. D'autres auteurs s'attachèrent à évaluer le taux de l'antigène dans le précipité grâce à l'emploi d'antigènes facilement décelables par

---

(*) On sait comment ces travaux ont conduit Ramon à la découverte des anatoxines [751]. En 1921, au cours de ses premières expériences, Ramon avait pris tout d'abord le phénomène de floculation spécifique pour la conséquence d'une contamination microbienne. La nécessité d'éviter de telles souillures conduisait à employer un antiseptique. Il s'adressa au formol. Dans ces conditions, non seulement la floculation spécifique avait encore lieu, mais encore la toxine, soumise à la double influence du formol et de la chaleur, perdait rapidement son pouvoir toxique.

(**) Voir en particulier [299, 262, 583, 836].

l'analyse (Wr [986, 987]) ; l'hémoglobine, par exemple, peut être dosée colorimétriquement ; avec une protéine iodée, l'iode est décelable chimiquement. Ces procédés, excellents dans des cas particuliers, ne sont pas d'un emploi général.

Depuis une trentaine d'années, les méthodes d'analyse microchimiques, sous l'influence de Pregl (*), ont acquis une précision remarquable et un développement considérable.

C'est Heidelberger qui eut le mérite d'appliquer ces nouvelles méthodes à l'immunochimie (**). Les notions de titre et d'unité étaient désormais remplacées, entre autres exemples, par un chiffre indiquant la teneur en azote du floculat spécifique. Cette donnée, beaucoup plus précise et plus absolue, permettait des comparaisons fructueuses entre différents systèmes immunologiques.

Ces nouvelles techniques, entre les mains d'Heidelberger et Kendall en particulier [364, 381, 377], ont permis d'acquérir une somme importante de renseignements sur la nature de la réaction antigène-anticorps elle-même. Au cours de ces travaux, ce fut le plus souvent à la réaction de précipitation que l'on s'adressa. C'est, en effet, la réaction la plus simple. Elle n'exige pas, comme l'hémolyse ou la bactériolyse, l'intervention d'un troisième facteur, le complément ou alexine. De plus, dans une large gamme des conditions du milieu, on n'observe pas la superposition à la réaction antigène-anticorps d'autres phénomènes physiques ou chimiques. On ne peut étudier, par exemple, le rôle de la concentration saline dans la réaction globule rouge-hémolysine, puisque la simple dilution du milieu amène une hémolyse non spécifique par hypotonie. La réaction de précipitation spécifique est donc beaucoup plus souple. Elle est en même temps plus générale : on sait actuellement que

(*) Voir [735].

(**) On trouvera dans un récent article d'Heildelberger [358], l'historique de ces questions.

les réactions d'agglutinations (microbienne ou globulaire) sont tout à fait superposables aux réactions de floculation : dans les deux cas, il s'agit d'une agglomération spécifique de particules, cellulaires dans un cas, micellaires ou moléculaires dans l'autre.

Bien plus, on peut augmenter énormément la sensibilité de la réaction de précipitation en la transformant artificiellement en réaction d'agglutination. C'est le principe des « réactions au collodion ». On veut mettre en évidence des quantités très faibles d'antigène ou d'anticorps, quantités incapables, par elles-mêmes, de donner lieu à une agrégation visible. On les adsorbe sur des particules de collodion (Cannon [123]) et, dans certaines conditions, cette adsorption n'est pas accompagnée de modifications des propriétés immunologiques. Lorsqu'on met ensuite en contact ces particules de collodion recouvertes, par exemple, d'antigène avec une solution de l'anticorps correspondant, il se produit une agglutination, très facilement observable, des particules. Goodner a pu ainsi déceler des anticorps dans des dilutions à IO ^{10} [313] (*).

La distinction des anticorps en dénominations basées sur leurs propriétés (précipitines, agglutinines, opsonines, hémolysines, etc.) semble indiquer qu'un anticorps ne produit que l'une de ces réactions. Dean a bien montré qu'en réalité une même substance anticorps pouvait manifester plusieurs activités immunologiques différentes [165] (**) : nous avons vu que l'antitoxine diphtérique possède, en plus de ses propriétés neutralisantes, un pouvoir floculant; le complexe ainsi formé fixe l'alexine [165].

Zinsser [9] a donc pu formuler une conception « unitaire » des anticorps, admise par tous maintenant : « les anticorps sont tous du même type, construits sur le même plan, agissent semblablement et se distinguent seulement par leur spécificité ».

(*) Voir aussi [233, 962, 546].

(**) Consulter à ce sujet l'ouvrage de M. Nicolle [652].

Il y a donc un nombre illimité d'anticorps, répondant au nombre illimité d'antigènes possibles. Leur façon de se manifester varie, non pas en raison de leurs constitutions différentes, mais suivant les conditions du milieu et les aptitudes de l'antigène correspondant (Wolfromm).

Aussi a-t-on l'habitude, depuis Bordet [80, 81], de considérer que les réactions sérologiques procèdent en deux temps :

— Dans une première phase, la plus importante, l'antigène s'unit simplement à l'anticorps.

— La deuxième phase comprend les réactions qui sont la conséquence de cet accolement : précipitation, agglutination, hémolyse, etc. C'est cette deuxième phase que nous pouvons directement observer.

Le premier temps existe toujours, mais ne peut être mis en évidence qu'indirectement. Dans certaines conditions, au contraire, le deuxième temps peut manquer.

Comme nous ne tarderons pas à le montrer, le premier temps est rapide, s'accompagne d'une libération d'énergie importante et fait preuve d'une spécificité beaucoup plus élevée que le second.

Il ne faut pas croire que cette distinction en deux phases soit absolue : bien au contraire, elles empiètent l'une sur l'autre et, le plus souvent, la deuxième phase commence déjà alors que la première n'est pas entièrement terminée.

Nous étudierons donc successivement les deux temps de la réaction de précipitation antigène-anticorps (chapitres II et III). Nous signalerons au fur et à mesure les techniques d'étude qui découlent de certaines propriétés fondamentales.

Nous terminerons enfin (chapitre IV) par une brève revue des théories émises pour expliquer le mécanisme de la précipitation spécifique.

CHAPITRE II

PREMIÈRE PHASE : COMBINAISON ANTIGÈNE-ANTICORPS

Il est admis, à l'heure actuelle, que la combinaison de l'antigène avec l'anticorps est un phénomène de nature chimique.

Nous avons vu que l'antigène possède un assemblage bien déterminé de fonctions et de groupements chimiques qui forment à sa surface un « motif spécifique ». Au cours de la formation de l'anticorps, la molécule de globuline acquiert une surface douée d'une affinité spéciale et spécifique pour les « groupements déterminants » de l'antigène. Une bonne preuve de la nature chimique de la combinaison spécifique est la possibilité d'inhiber la précipitation par de simples haptènes, possédant un « motif » identique ou voisin, et incapables de floculer par eux-mêmes l'anticorps [592, 351].

La réaction de précipitation spécifique est, avec la réaction enzyme-substrat, la seule réaction entre macromolécules qui ait été bien étudiée.

Après ce que nous avons dit de la nature des anticorps et de la structure de la majorité des antigènes, nous voyons que la réaction antigène-anticorps sera le type même des réactions entre protéines.

I. — FORCES UNISSANT L'ANTIGÈNE A L'ANTICORPS

Les protéines antigène et anticorps vont réagir par leur surface. Lorsqu'on étale une protéine en lame mince, à l'interface eau-air, on crée ainsi une nouvelle configuration de la surface extérieure de cette protéine. Danielli, Danielli et Marrack ont montré qu'on modifiait ainsi profondément les possibilités d'union de l'antigène à l'anticorps [160].

Les forces intermoléculaires entrant en jeu dans l'accolement de l'anticorps et de l'antigène sont donc des forces pouvant exister entre les groupements superficiels de ces protéines. On a l'habitude de classer ces forces en deux groupes (*) :

— forces intermoléculaires fortes;
— forces intermoléculaires faibles.

A. — Forces intermoléculaires fortes

a) Le premier mode de liaison qui vient à l'esprit est l'attraction entre des charges électriques de signes opposés. Nous savons que la molécule protéidique est hérissée de fonctions ionisées $-NH_3^+$ ou $-COO^-$, en proportions variables selon le *p*H du milieu où elle se trouve. Ces fonctions « polaires » auront tendance à s'attirer réciproquement par des forces de Coulomb, formant une liaison « électrovalentielle », « hétéropolaire », ou encore « ionique » (**).

L'union entre antigène et anticorps pourrait se faire suivant ce mécanisme (Heidelberger et Kendall [364]). En effet, la réaction est très rapide et facilement réversible, comme nous le verrons bientôt. Landsteiner avait noté l'influence prépondérante des fonctions acides de l'antigène,

(*) On consultera avec fruit l'ouvrage de Pauling [686] et une récente mise au point du même auteur intitulée : « Molecular Structure and intermolecular forces », parue dans le livre de Landsteiner [4].

(**) Cette liaison est aussi celle qui unit l'ion acétate à l'ion sodium dans la molécule d'acétate de sodium $CH_3COO-Na$.

et le changement de spécificité qu'entraîne leur estérification. On pourrait objecter qu'un mécanisme de liaison si simple ne suffit pas à expliquer la spécificité des réactions sérologiques. Cependant, si un certain nombre de ces groupements aminés ou carboxyliques forment, par leur ensemble, le motif spécifique, la multitude des configurations spatiales possibles peut largement suffire à expliquer la spécificité.

Dès 1907, Teagle et Field avaient montré que les charges des bactéries et des agglutinines correspondantes étaient opposées [909]. Un magnifique et récent travail de Loiseleur [528] a permis de bien saisir la valeur des forces ioniques dans la liaison antigène-anticorps. Pour cet auteur, la condition que doit remplir une molécule pour être un anticorps et entraîner la floculation d'un antigène protéique est de neutraliser simultanément l'ensemble de toutes les charges électriques de l'antigène. Un anticorps doit donc constituer une réplique électrique exactement adaptée à la structure de l'antigène. C'est ce qu'il obtient en renversant le signe de chacune des charges électriques d'un protéide. En électrodialysant, dans certaines conditions, un protéide en présence de cuivre puis en le soumettant à l'action du sulfure de carbone [526], Loiseleur transforme un protéide de type $^{-}OOC-P-NH_3^{+}$ en un « contre protéide » $^{+}Cu\,OOC-P-NHCSS^{-}$. Bien entendu, la disposition stéréochimique des nouvelles fonctions polaires du contre-protéide sera analogue à celle du protéide initial.

Le contre-protéide ainsi obtenu flocule le protéide de départ d'une manière strictement spécifique. Les phénomènes de zone (*) observés dans la réaction sont tout à fait analogues à ceux que l'on obtient dans les réactions antigène-anticorps authentiques. Bien plus, des venins traités *in vitro* par le contre-venin synthétique deviennent atoxiques.

(*) Voir plus loin, p. 78.

Cependant, la liaison hétéropolaire ne saurait suffire à expliquer que des groupements de composition chimique différente soient parfois équivalents immunologiquement. Viscontini [948], étudiant la charge des bactéries au cours de leur union aux agglutinines spécifiques, n'a pu réussir à expliquer la formation des agglomérats microbiens par des modifications de charge électrique.

b) Il ne semble pas que les liaisons de covalence, ou liaisons homopolaires (*), consistant dans le partage d'une paire d'électrons entre deux atomes, interviennent dans les réactions que nous étudions.

B. — Forces intermoléculaires faibles

Ce sont ces forces qui attirent l'un vers l'autre des groupements non ionisés, non chargés (groupements « apolaires »). Ces forces sont justement celles qui confèrent à la molécule protéidique sa structure secondaire, en rapprochant certains groupements des chaînes peptidiques. Considérées isolément, ces forces représentent une énergie assez faible, mais leur multiplication dans la molécule et l'addition de leurs effets peuvent conduire à des liaisons assez stables.

On distingue souvent, parmi ces forces, les forces de Van der Waals (London [541]) et les liaisons hydrogène (Latimer [500]).

Les premières consistent dans l'attraction électronique existant entre tous les atomes d'une molécule et tous les atomes des autres molécules situées dans le voisinage immédiat. Ces forces, plus importantes pour les atomes lourds que pour les atomes légers, augmentent très rapidement quand la distance interatomique décroît. C'est pourquoi l'attraction électronique de type Van der Waals, entre deux molécules en contact, est due pratiquement entièrement aux interactions des paires d'atomes (dans les deux molécules) qui

(*) Ce sont les liaisons habituelles de la chimie organique, celles qui unissent entre eux les différents $-CH_2-$ qui forment par exemple une chaîne polyméthylénique.

sont eux-mêmes en contact. La force de l'union est déterminée par le nombre de paires d'atomes qui peuvent être amenées en contact. Donc, deux molécules qui peuvent accoler étroitement des portions importantes de leur surface (*) s'attireront en général beaucoup plus que des molécules dont la topologie superficielle présentera une adaptation moindre.

La liaison hydrogène (**), ou « chélation », résulte de l'attraction d'un atome d'hydrogène attaché à un atome électronégatif par une paire d'électrons non partagée d'un autre atome électronégatif. C'est celle qui, dans l'aldéhyde salicylique par exemple, unit l'hydrogène du groupement phénol à l'oxygène de la fonction aldéhyde. Ce mode de liaison jouerait aussi un rôle très important dans le maintien de la structure des protéines, en repliant les chaînes peptidiques primaires, conférant à la molécule sa structure globulaire (Huggins [430]).

Quels que soient les forces et le mode d'union unissant l'antigène à l'anticorps, nous voyons que la liaison sera d'autant plus solide que la spécificité réciproque sera plus étroite : si deux grosses molécules ont des formes telles que leurs surfaces ne puissent entrer en contact que par quelques points isolés, l'attraction par forces de Van der Waals sera faible. Si, de plus, la répartition des groupements ionisés de charge opposée et des groupements susceptibles de former des liaisons hydrogène, fait que seulement quelques-uns de ces groupements sont susceptibles d'être en interaction réelle, les molécules n'auront que peu de tendance à s'accoler.

Au contraire, deux molécules ayant des configurations complémentaires et dont les surfaces s'adaptent réciproquement, contracteront des liaisons énergétiquement fortes

(*) C'est ce qui se produit lorsqu'on met en présence des substances contenant des fragments moléculaires identiques. On dit alors qu'on a « solvation réciproque » de ces fragments (chaînes polyméthyléniques, par exemple).

(**) Voir [231] et [858].

par forces de Van der Waals. Si, de plus, les groupements polaires des deux molécules sont disposés de manière à ce que les groupements porteurs de charges opposées soient proches les uns des autres, si les groupements générateurs de liaison hydrogène peuvent former le maximum de liaisons possibles, et si aucun groupement, même immunologiquement inactif, ne vient entraver leur approche, l'énergie totale d'interaction et d'attraction des deux molécules sera grande (Pauling).

C'est qu'en effet, des phénomènes d'empêchement stérique viennent parfois entraver la formation du complexe antigène-anticorps. Si l'on élimine ces groupements inhibants, dans l'anticorps par exemple, cette protéine acquiert une affinité encore plus grande pour l'antigène : c'est dans ce sens qu'il faut probablement interpréter les toutes récentes expériences d'Eggerth [229]. Cet auteur a montré qu'un immunsérum de Lapin, sur lequel on fait agir, dans certaines conditions, de la ninhydrine, voit son pouvoir anticorps doubler, tout en gardant une spécificité stricte. C'est la première fois qu'on a réussi à augmenter ainsi l'activité d'un immunsérum, *in vitro,* par des moyens exclusivement chimiques. Ce travail initial laisse espérer des répercussions sérologiques importantes (*).

L'étude des réactions immunologiques en lames minces nous donne encore quelques renseignements fort instructifs sur le mode de liaison antigène-anticorps. On sait, depuis les expériences de Danielli [160, 805], que l'étalement à la surface de l'eau d'un anticorps lui fait perdre ses propriétés de réagir spécifiquement avec l'antigène. Il se produit ainsi un déplissement de la molécule qui, s'il n'entraîne pas de modifications chimiques importantes, perturbe considérablement la configuration spatiale et l'emplacement relatif des différents groupements de la molécule. Cependant, si

(*) Tayeau, Pautrizel et Faure, avec le système sérum de Cheval-anti-sérum de Lapin, observent que la vitesse de floculation augmente beaucoup lorsqu'on traite l'anticorps par la ninhydrine *(communication orale)*, le titre en anticorps restant le même.

les couches d'anticorps, disposées elles-mêmes sur des couches de stéarate de baryum ont une épaisseur suffisante pour permettre à l'anticorps de conserver sa forme globulaire native, ce dernier garde une partie au moins de ses affinités initiales (Porter et Pappenheimer [734]).

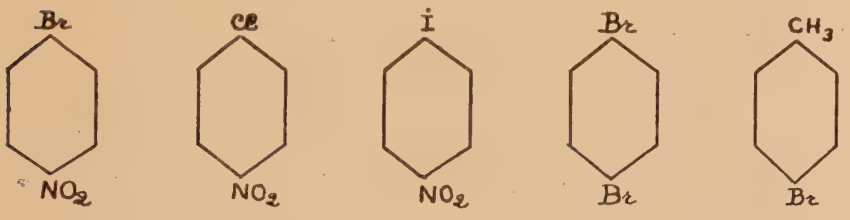
Au contraire, l'étalement de l'antigène à l'interface eau-air lui permet de réagir encore avec l'anticorps homologue [807, 806]. Bien plus, dans ces conditions, le contact intime entre les deux agents spécifiques n'est même pas indispensable. Rothen a signalé tout récemment [801, 804] que si l'on transfère un film d'antigène sur une surface métallique parfaitement polie et qu'on le recouvre de couches minces de différentes substances (stéarate de baryum, octadécylamine, formvar), cet antigène peut encore retenir l'anticorps homologue. On peut évidemment objecter que l'écran intermédiaire n'est pas homogène et ne masque pas entièrement l'antigène. L'anticorps pourrait donc s'unir à l'antigène par les lacunes du film de substance inerte [688]. Cependant, cette critique ne semble pas fondée [804]. Il faudrait donc admettre que le champ de forces d'attraction s'étend non seulement à quelques angströms de la grosse molécule, mais se fait encore sentir à plusieurs dizaines, voire à une centaine d'angströms. Il semble qu'il en soit de même pour l'action d'un enzyme sur son substrat [803]. Ces récents travaux mettent bien en évidence le rôle de forces purement physiques dans la formation des complexes antigène-anticorps.

Y a-t-il d'autres exemples d'union entre molécules donnant lieu à une spécificité aussi étroite ? En écartant la réaction enzyme-substrat, qui ne pourrait nous éclairer en raison de sa complexité, c'est seulement dans le domaine cristallographique que l'on trouve une spécificité aussi stricte. La croissance d'un cristal par incorporations successives de molécules semblables disséminées dans une solution parmi une multitude de molécules différentes, est à rapprocher de la formation du précipité spécifique par

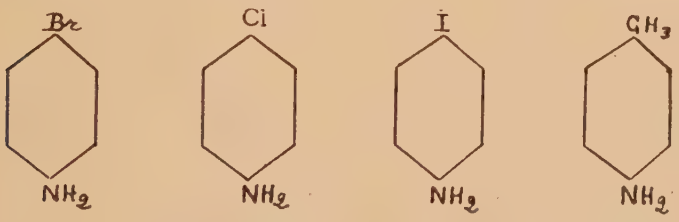
union élective de molécules d'antigène et d'anticorps.

Dans le cristal, l'empilement est effectué de telle sorte que chaque molécule est entourée aussi étroitement que possible par les autres molécules. Si, par la pensée, on enlève une molécule de l'intérieur du cristal, la cavité résultante aurait la forme de la molécule elle-même. D'autres molécules, de forme et de structure différentes, ne pourraient s'adapter aussi étroitement à cette cavité et ne peuvent être incorporées au cristal en formation.

On a pu faire, d'ailleurs, des comparaisons fort intéressantes entre l'équivalence d'atomes ou de radicaux dans les cristaux et dans les réactions immunologiques (Erlenmeyer et Berger [242]). Par exemple, les corps :



donnent des cristaux mixtes. D'autre part, les azoprotéines réalisées avec les amines suivantes :



sont pratiquement équivalentes (Landsteiner [493]).

En fait, la formation de cristaux mixtes est un test beaucoup plus sévère que la correspondance immunologique, car les molécules doivent concorder dans les trois dimensions de l'espace. L'adsorption à la surface des cristaux s'en rapproche beaucoup plus. La surface des cristaux possède,

en effet, la propriété d'orienter la cristallisation de molécules différentes, mais dont certaines dimensions interatomiques présentent quelque rapport avec celles des premières. C'est le phénomène d' « épitaxie » [808, 172]. Nellenstein [639] a montré que le bleu de méthylène peut être adsorbé par le diamant et non par le graphite. C'est l'inverse avec l'acide succinique. France [276] trouve, de même, que l'alun a des propriétés adsorbantes très différentes pour deux colorants extrêmement voisins, puisqu'ils sont isomères.

Ceci nous montre le rôle capital que jouent dans l'accolement des molécules, non seulement les différents types de forces tendant à les réunir, mais encore la correspondance exacte entre certaines dimensions interatomiques.

Signalons d'ailleurs que, réciproquement, la cristallisation d'une substance minérale est profondément modifiée par la présence de colloïdes, et tout spécialement de protéines. Notons encore que la cristallisation du chlorure de sodium en présence de sérum est perturbée quand ce dernier provient d'un animal en cours d'immunisation (Lecomte du Noüy [506]).

Ainsi donc, nous voyons, par un curieux retour des choses, les chercheurs actuels essayer d'entrevoir la solution de problèmes immunologiques à la lueur de considérations sur la formation des cristaux. Ils remontent ainsi le cours des travaux de Pasteur qui, parti de recherches purement cristallographiques, avait découvert les phénomènes d'immunité.

II. — ÉTUDE DE LA PREMIÈRE PHASE

Le premier temps de la réaction antigène-anticorps est extrêmement rapide : souvent, en mélangeant l'antigène et l'anticorps, le précipité apparaît instantanément. Follensby et Hooker [266] ont montré que, dans les mélanges toxine-antitoxine, 99 p. 100 de la toxine se combinent en moins de

dix minutes, probablement seulement en quelques secondes. D'autres auteurs ont observé que, même à la température de 0° C., la combinaison se fait encore dans l'espace de quelques secondes [222, 382, 600].

Si la réaction est rapide, l'énergie dégagée doit être assez importante. Bayne-Jones avait observé, dans la réaction toxine-antitoxine diphtérique, un dégagement de 0,064 calorie par unité toxique [46]. Ce chiffre semblait élevé, et Smith et Marrack n'ont pu le retrouver [862]. Ces travaux ont été repris récemment par Boyd [89] avec un appareillage très perfectionné. Cet auteur a trouvé un dégagement de trois calories par gramme d'azote antigénique.

Cette énergie réactionnelle semble donc indiquer que la liaison antigène-anticorps est assez forte [940] : le complexe spécifique résiste souvent à un traitement chimique relativement violent. C'est ainsi, par exemple, qu'on peut dissoudre le précipté caséine-azo-acide arsalinique-anticorps correspondant dans une solution de soude diluée; lorsqu'on neutralise ensuite cette base, on reprécipite le complexe antigène-anticorps sans libérer d'anticorps dans le liquide surnageant (*).

Il est cependant possible, avec des réactifs plus énergiques, de dissocier profondément le complexe [431, 255, 378, 306, 307, 363, 149]. La quantité d'anticorps que l'on peut ainsi récupérer dépend en grande partie de la nature de l'anticorps étudié : les anticorps antipneumococciques sont parmi les plus faciles à libérer de leur union avec l'antigène. Nous verrons d'ailleurs plus loin que certains phénomènes, comme la redissolution du précipité spécifique dans un excès d'antigène, ne peuvent s'expliquer que par la réversibilité des réactions spécifiques.

Au cours de l'union de l'antigène à l'anticorps, les molécules entrant en jeu ne subissent aucune altération chimique profonde. La toxine, par exemple, voit ses propriétés

(*) Voir Boyd [2], p. 164.

nocives seulement masquées quand elle se lie à l'antitoxine. Lorsqu'on dissocie le complexe ainsi formé, la toxine reprend ses propriétés originelles; de même, l'antitoxine est toujours neutralisante (*).

Il est difficile d'étudier le rôle de différentes variables, température, *p*H, concentration saline, etc., sur le premier temps des réactions de précipitation spécifique : il est en effet difficile d'isoler artificiellement cette phase, qui est suivie immédiatement des phénomènes visibles qui forment justement la deuxième phase de la réaction. Si une variation donnée fournit une quantité plus faible de précipité spécifique, doit-on en conclure que moins d'antigène et d'anticorps se sont combinés ou, au contraire, qu'une quantité moindre du complexe s'est insolubilisée ?

Il semble cependant prouvé [375] qu'en présence de concentrations salines élevées, la combinaison se fait mal. Ceci serait dû à la présence d'une atmosphère d'ions salés autour des groupements polaires de charge opposée, à la fois de l'antigène et de l'anticorps, diminuant ainsi leur affinité réciproque. Dans ces expériences, on peut aussi envisager que cette concentration saline entraîne des modifications physiques de l'antigène [367, 368].

Signalons enfin quelques variations physiques observables dans le milieu où s'effectue la première phase de la réaction antigène-anticorps.

Il ne se produit tout d'abord aucune variation de *p*H (Smith et Marrack [862]) : ceci doit donc nous faire admettre que les groupements acides et basiques, s'ils jouent un rôle dans l'accolement moléculaire, doivent être en nombre à peu près égal sur l'antigène et sur l'anticorps, contrairement à l'opinion de Bachmann [37].

On observe une variation assez importante de l'indice de réfraction du milieu. Cette variation peut servir à suivre l'évolution de la réaction [247, 536].

Les modifications de la tension superficielle ne sont pas

(*) Elle a cependant perdu son pouvoir floculant.

encore élucidées : pour certains, la baisse de la tension est nette (Ascoli [31]), se traduisant par une augmentation du nombre de gouttes, mesuré au moyen du compte-gouttes de Duclaux ou du stalagmomètre de Traube. Pour d'autres (Ramsdell [779]), utilisant des méthodes de mesure plus perfectionnées, on n'observerait pas de changements notables.

Ce sont surtout les variations de la viscosité qui sont importantes au cours de cette première phase. Signalées tout d'abord par Lecomte du Noüy [504], elles ont permis d'étudier les réactions spécifiques du sérum antidiphtérique [507], du sérum antivipérin [527] et des contre-protéides [528]. On a pu déceler par cette méthode, tout récemment, l'existence d'anticorps dans le sérum des animaux soumis à

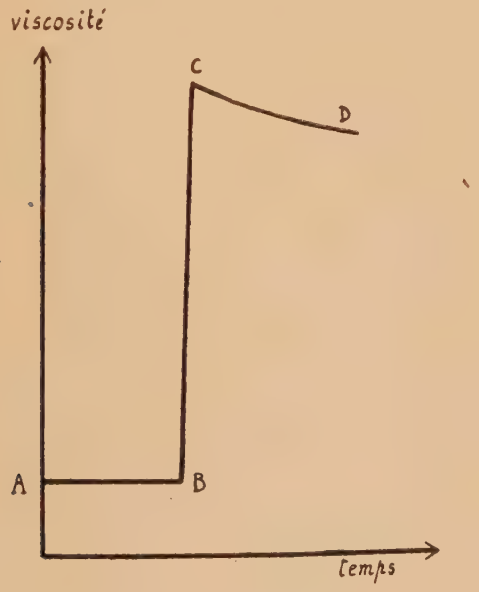


Fig. 2.

Variations de la viscosité au cours de la réaction antigène-anticorps. D'après Loiseleur [536].

A B : Viscosité initiale de l'antigène.
B : Introduction de l'anticorps.
B C : 1re phase d'accolement moléculaire.
C D : 2e phase de floculation.

l'immunisation bien avant l'apparition de précipitines [539]. L'augmentation de la viscosité survient dès la première phase d'accolement moléculaire, précédant la floculation (fig. 2, p. 75). Ces mesures viscosimétriques sont beaucoup plus sensibles que la simple observation des floculats.

Nous venons de voir comment se fait l'union de l'antigène et de l'anticorps. Quelquefois, la réaction ne va pas plus loin : aucun précipité ne se produit. C'est ce qu'on observe avec certains haptènes. On trouve aussi, parfois, dans un immunsérum, des anticorps susceptibles de se combiner à l'antigène, mais incapables de donner avec lui un complexe insoluble [374, 679, 382] (*). Comment peut-on alors se rendre compte de la réalité de la combinaison ? En dehors des procédés purement physiques déjà signalés (calorimétrie, réfractométrie, tensiométrie, viscosimétrie), il existe une méthode purement immunologique qu'il convient de signaler maintenant : c'est la réaction d'inhibition (Halban et Landsteiner [334]).

On fait agir sur une même quantité d'antisérum des quantités croissantes de haptène. Après un certain temps de contact, on ajoute l'antigène vrai : on n'observe pas de précipitation dans les mélanges où l'anticorps avait déjà été complètement saturé par le haptène.

D'autres auteurs [24] ont pu, dans des cas analogues, mettre facilement en évidence la liaison antigène-anticorps en se basant sur le fait que le complexe fixe le complément. Nous ne pouvons entrer ici dans les détails techniques de cette réaction (**), mais nous devons insister sur ce phénomène assez curieux. Un immunsérum, décomplémenté par chauffage à 56° C., garde néanmoins la totalité de son pouvoir précipitant. L'alexine ne semble donc pas inter-

(*) On parle, dans ce cas, d'anticorps « incomplet », « imparfait ». Heidelberger l'appelle anticorps « univalent » [358], mais en réalité le terme « univalent » n'est pas employé ici dans un sens très correct [382].

(**) On trouvera tous les renseignements nécessaires dans la thèse de Ranque [780].

venir dans la réaction. Cependant, l'introduction de globules rouges sensibilisés dans un mélange d'immunsérum de Lapin, d'antigène correspondant et de sérum frais alexique, n'est suivie d'aucune hémolyse (Gengou [296]).

Un peu plus tard, Gay [294] montre la sensibilité extrême de cette réaction : des précipités, trop peu abondants pour être visibles à l'œil nu, peuvent réaliser l'adsorption; la moindre trace du complexe spécifique fixe une partie appréciable du complément [619, 637, 282, 626].

On a pu appliquer cette méthode à l'étude de la réaction toxine-antitoxine diphtériques [655, 166, 789] et au diagnostic clinique du kyste hydatique [298, 961]. Mais l'excès de sensibilité (*) de cette réaction rend ses applications quantitatives délicates.

(*) Dans les conditions optima, on peut obtenir la réaction de précipitation spécifique avec des dilutions de polyosides microbiens allant jusqu'à 1 p. 5.000.000. Avec la méthode de fixation du complément, on arrive à 1 p. 20.000.000.

CHAPITRE III

DEUXIÈME PHASE : PRÉCIPITATION DU COMPLEXE

Le plus souvent, l'union des deux agents est suivie, plus ou moins rapidement, de la formation d'un précipité. Cette réaction de floculation spécifique est extrêmement complexe. Malgré de nombreux travaux, le mécanisme exact de l'insolubilisation du complexe est loin d'être parfaitement connu.

Nous étudierons tout d'abord la nature du complexe antigène-anticorps et les différents facteurs susceptibles d'influencer sa composition. Nous verrons enfin les renseignements que peut nous fournir la mesure de la vitesse de précipitation.

I. — ÉTUDE DU PRÉCIPITÉ

A. — Le phénomène de zone

Pour étudier la précipitation d'un antigène par un anticorps homologue, on a l'habitude de faire varier les proportions relatives des deux agents en présence.

L'une des méthodes les plus employées consiste à mettre dans une série de tubes une quantité déterminée et fixe de l'un des produits. On lui ajoute des quantités croissantes ou décroissantes de la deuxième substance. Très souvent, c'est cette dernière alternative qui est utilisée : on ajoute alors

un même volume de solutions de plus en plus diluées. Ceci facilite beaucoup la pratique des opérations, permettant en particulier l'emploi d'un rhéomètre. Ce protocole permet, de plus, d'opérer à volume constant.

Répartissons par exemple l'immunsérum en quantité égale dans tous les tubes de la série. On introduit ensuite dans chaque tube, en allant de gauche à droite, des quantités décroissantes de l'antigène correspondant; ou encore, pour opérer à volume constant, des volumes égaux d'une dilution croissante de l'antigène.

Dans les tubes de gauche, où l'antigène est en grand excès par rapport à l'anticorps, nous ne voyons aucun précipité. Il n'y a pas assez d'anticorps pour entraîner l'antigène dans une phase insoluble. Ce fait avait été mis en évidence, dès 1902, par Michaelis et Oppenheimer [609]. La même année, Danysz montrait que le mélange d'antiricine et de ricine ne floculait pas en présence d'un excès de ricine [161]. Ces faits ont été ensuite confirmés [668]. Cette région d'excès d'antigène, c'est la « prézone » (ou encore « prozone »). Avec Heidelberger, nous préférons l'appeler « zone d'inhibition » (*).

En allant vers la droite, le contenu des tubes se trouble progressivement. Nous avons d'abord un louche, puis un précipité de plus en plus abondant. Cependant, à l'extrême droite, où les quantités d'antigène sont infimes, où il y a donc un énorme excès d'anticorps, le précipité devient moins abondant et disparaît finalement (**). Cette absence de floculation dans les zones d'excès d'antigène ou d'excès d'anticorps, condamne définitivement les méthodes de titration basées sur la détermination des dilutions limites d'anti-

(*) Le terme « prézone » risque, en effet, d'amener des confusions. Il s'agit, nous venons de le voir, de la région d'excès d'antigène. Or, lorsqu'on étudie le phénomène d'agglutination, on observe des phénomènes analogues. Mais la technique employée est inverse : le taux de l'antigène est constant, et c'est l'antisérum qu'on dilue. La région de gauche, où souvent on n'observe pas d'agglutination, correspond à un excès d'anticorps; or, on l'appelle aussi prézone.

(**) Comme dans la « prézone » des réactions d'agglutination.

gène ou d'anticorps donnant encore un précipité (ou un anneau à l'interface dans la technique d'Uhlenhuth).

Pour bien comprendre ces phénomènes, il importe d'en avoir une vue quantitative. Certains auteurs ont cherché à estimer volumétriquement la quantité du précipité spécifique en centrifugeant les mélanges dans des tubes gradués. C'est une détermination assez imprécise. D'autres ont essayé de faire des mesures optiques du précipité [675, 248, 730] ou de mesurer la densité du liquide surnageant [660].

Mais la technique quantitative la plus utilisée est certainement celle d'Heidelberger (*) : les différents mélanges sont maintenus plusieurs heures en thermostat à 37° C., puis restent toute une nuit à la glacière. Le lendemain, les précipités sont centrifugés, recueillis, lavés deux fois à l'eau physiologique. On détermine leur teneur en azote total, selon la microtechnique de Kjeldahl (**), développée par Parnas et Wagner [684].

Représentons maintenant, graphiquement, la quantité d'azote total précipitée en fonction des quantités variables d'antigène et d'anticorps. Nous obtiendrons une certaine surface. Dans l'exemple précédent, nous opérions avec une quantité d'anticorps constante : il faut donc couper la surface obtenue par un plan; nous obtenons ainsi une courbe qui illustre notre expérience.

Cette courbe, comme nous l'avons déjà fait pressentir, sera dotée d'un maximum. Il faut signaler que l'aspect de la courbe sera différent suivant le système précipitant dont on est parti. C'est ainsi, par exemple, qu'un sérum de Cheval antitoxique donnera un précipité avec le poison microbien dans une zone relativement étroite. L'excès d'antigène, comme l'excès d'anticorps, amènera très vite l'existence de complexes solubles (fig. 3, courbe supérieure).

(*) On trouvera tous les détails techniques dans des articles d'Heidelberger [365, 366, 370]. En langue française, voir [421, 320].

(**) Voir [986, 987, 364, 358, 359, 88].

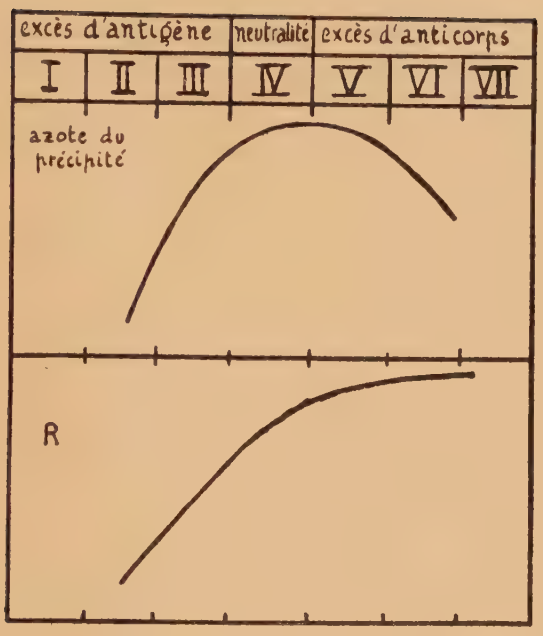


Fig. 3.

Sérum de Cheval antiprotéide. Variations de la teneur en azote du floculat et de sa composition en antigène et en anticorps suivant les proportions du mélange. D'après Boyd [2].

I. — Inhibition complète.
II. — Inhibition partielle.
III. — Excès d'antigène.
IV. — Zone d'équivalence.
V. — Excès d'anticorps.
VI. — Inhibition partielle.
VII. — Inhibition complète.

Au contraire, un sérum antipneumococcique de Cheval ou un quelconque immunsérum de Lapin ne présente pas ce phénomène : le floculat existe aussi dans la région d'excès d'anticorps; la zone d'inhibition est analogue à celle du sérum antidiphtérique de Cheval (fig. 4, courbe supérieure).

Oudin [671] a préconisé récemment la représentation semi-logarithmique des courbes de précipitation, la quantité d'antigène étant exprimée par son logarithme. Cet artifice permet de comparer beaucoup plus aisément entre eux des antigènes différents. Si l'on étudie, en effet, deux systèmes précipitants formés par le même antigène, mais à des dilu-

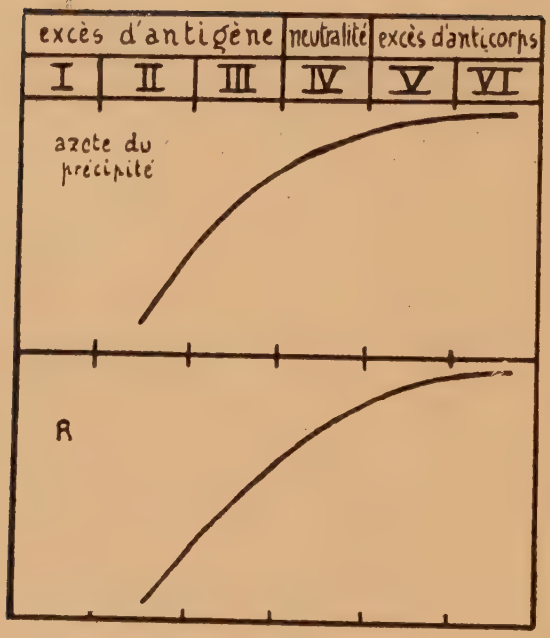


Fig. 4.

Antisérum précipitant de Lapin. Variations de la teneur en azote du floculat et de sa composition en antigène et en anticorps, selon les proportions du mélange. D'après Boyd [2].

I. — Inhibition complète.
II. — Inhibition partielle.
III. — Excès d'antigène.
IV. — Zone d'équivalence.
V. — Excès d'anticorps.
VI. — Grand excès d'anticorps.

tions différentes, les courbes obtenues seront dissemblables avec la représentation graphique habituelle (fig. 5, courbe A). Au contraire, avec la représentation semi-logarithmique, les deux courbes seront identiques, l'une étant simplement décalée par rapport à l'autre, le long de l'axe des abcisses. La similitude de l'antigène dans les deux systèmes apparaît ainsi plus nettement (fig. 5, courbe B).

La région où le précipité est le plus abondant est la zone d' « équivalence » ou « zone de neutralité ». Nous verrons bientôt que c'est aussi, au point de vue de la vitesse de réaction, la « zone optimum ». La largeur de la zone d'équivalence varie beaucoup suivant le degré d'immunisation de

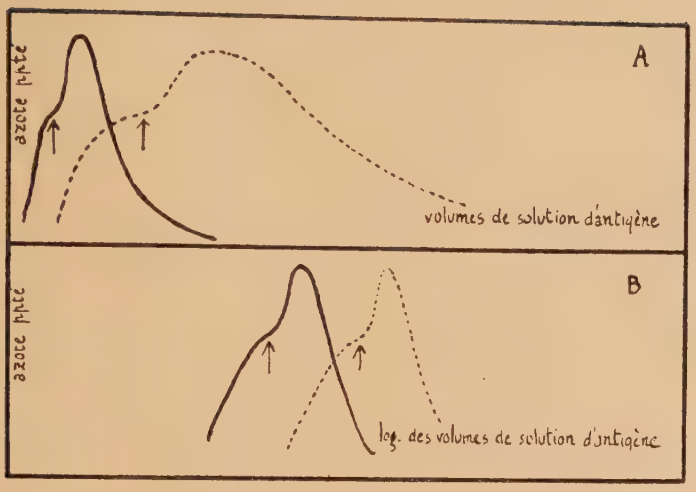


Fig. 5.

En trait plein : courbes de précipitation spécifique ovalbumine-antisérum de Lapin. — En pointillé : courbes avec la même solution d'antigène diluée au cinquième et le même sérum. Les flèches indiquent l'équivalence. D'après Oudin [671].

l'animal : elle devient beaucoup plus large par hyperimmunisation [374, 382].

Le comportement spécial des antitoxines de Cheval se comprend assez facilement. Dans la zone d'excès d'anticorps, le complexe atoxique est soluble : les anticorps, dans ce cas particulier, se localisent dans la fraction pseudoglobulinique du sérum, alors que dans l'antisérum de Lapin, on les trouve dans les euglobulines. Or, le caractère de grande solubilité des pseudoglobulines, en comparaison des euglobulines, est bien connu.

B. — Composition du précipité

Que le précipité contienne à la fois l'antigène et l'anticorps, cela nous semble évident aujourd'hui. La question s'est néanmoins posée au début des recherches immunologiques.

Dès 1901, plusieurs auteurs [523, 502, 117] montraient que

le complexe spécifique est beaucoup plus riche en « albumine » que l'antigène. Von Dungern et Cohnheim [219], un peu plus tard, mettaient en évidence du cuivre dans la combinaison hémocyanine (*)-anticorps homologue, montrant ainsi nettement la participation de l'antigène à la formation du floculat.

On ne saurait cependant affirmer que le précipité ne contienne uniquement que l'antigène et l'anticorps. Il renferme souvent un pourcentage appréciable de substances lipoïdiques (**). Nous avons déjà signalé la présence du complément. La part qui revient pondéralement à l'alexine est extrêmement minine. On a pu d'ailleurs montrer [590, 371, 372] que le précipité, après plusieurs lavages à l'eau physiologique, ne contient que des traces infimes de protéides sériques non spécifiques.

Si l'antigène possède un groupement ou un atome facilement identifiable (arsenic pour une protéine-azo-atoxyl, iode pour une iodoprotéine), il est possible de déceler et de doser ces éléments dans le floculat. La comparaison de la teneur en azote total et de la teneur en élément « marqué » nous fournira rapidement la valeur du rapport R de l'anticorps à l'antigène dans le complexe. Certaines azoprotéines fortement colorées en rouge sont des antigènes techniquement très appropriés à ce genre de détermination. La composition des précipités est très variable selon les doses d'anticorps et d'antigène mises en présence [377] : les flocons obtenus prennent des teintes allant du rose au rouge foncé.

En général, le précipité est plus riche en anticorps, et R est supérieur à 1. Cela tient à ce que la masse moléculaire de l'anticorps est beaucoup plus importante que celle de l'antigène. Lorsqu'au contraire, on emploie des antigènes de poids moléculaire très élevé (hémocyanines), c'est l'inverse qui se produit.

(*) L'hémocyanine est un métalloprotéide cuprique.

(**) Nous verrons ce point en détails dans le deuxième chapitre de la partie expérimentale.

L'accolement de l'antigène à l'anticorps est un phénomène de surface : il faudra donc d'autant moins d'anticorps pour précipiter un antigène que la surface développée par ce dernier sera plus faible. Zinsser [992], se basant sur ce fait, a pu expliquer pourquoi il faut moins d'anticorps pour agglutiner des bactéries que pour floculer une protéine. Boyd et Hooker [90, 91] ont d'ailleurs pu relier le poids moléculaire M de l'antigène au rapport R, $\frac{\text{anticorps}}{\text{antigène}}$ du précipité par une relation théorique :

$$R = 37.800\ M^{-0,8} + 179\ M^{-0,35}$$

qui s'accorde assez bien avec les données expérimentales.

Traçons maintenant, pour un système quelconque, la courbe des variations du rapport R en fonction des proportions différentes d'antigène et d'anticorps. Nous constatons, quel que soit le type du sérum floculant, la même allure des courbes (partie inférieure des fig. 3 et 4).

L'antigène et l'anticorps peuvent s'unir dans des proportions variables : de plus, il y a toute une gamme progressive de combinaisons.

Quand on augmente la teneur du mélange initial en anticorps, le précipité devient lui-même plus riche en anticorps [371, 372, 682]. Il n'y a pas simple proportionnalité. Quand le mélange devient de plus en plus riche en anticorps, R augmente d'abord rapidement, puis tend bientôt vers une limite supérieure. Il y a là une différence très nette avec le comportement des substances chimiques simples et une analogie frappante avec les réactions colloïdales.

En opérant avec des volumes constants d'immunsérum, on trouve de même que dans la région d'excès d'antigène (zone d'inhibition), le rapport R est plus faible que celui de la zone d'équivalence.

L'étude des complexes solubles nécessite certains artifices pour isoler les combinaisons antigène-anticorps. Grabar [324] a utilisé tout récemment dans ce but la précipitation

par l'alcool dans des conditions de concentration et de salinité appropriées. Notons d'ailleurs que la courbe de l'azote précipité en milieu alcoolisé, après être passée par un maximum, présente elle aussi une zone d'inhibition. Pour un système différent, le même auteur [322] a dû avoir recours à des procédés purement immunologiques.

La connaissance du rapport R et des masses moléculaires des constituants du précipité donne des renseignements sur la « formule », la « composition moléculaire » des complexes antigène-anticorps.

Le tableau III donne ces résultats (voir p. 87).

C. — Solubilité du précipité

Nous n'étudierons ici que la solubilité dans des solutions salines faiblement concentrées. Nous verrons, en effet, que le floculat spécifique peut se dissoudre dans de très nombreuses conditions.

La solubilité du précipité dans l'eau physiologique est presque nulle, et la pratique du lavage des agrégats, à deux ou trois reprises avant de les soumettre à l'analyse, est parfaitement justifiée [987, 905].

Heidelberger retrouve la même quantité d'azote dans le mélange initial que dans le liquide surnageant le précipité et le précipité lui-même, lavé à plusieurs reprises [369]. Lorsqu'on dilue le milieu où doit s'effectuer la réaction spécifique, on ne diminue pas la teneur du précipité en azote [371, 374]. La solubilité du complexe est donc très faible (0,0003 mg. d'azote/cm^3 [590]).

L'antigène et l'anticorps peuvent-ils exister ensemble en solution ? Il en est bien ainsi dans les zones d'inhibition, où peu ou pas de précipité n'apparaît. Dans la zone d'équivalence, au contraire, on ne peut déceler dans le liquide surnageant ni antigène, ni anticorps [591, 167, 158, 905]. Ce résultat a parfois été contesté [364, 372], mais il s'agissait le plus souvent alors de systèmes où les deux agents

TABLEAU III

COMPOSITION MOLÉCULAIRE DES PRÉCIPITÉS SPÉCIFIQUES. D'APRÈS GRABAR ET DERVICHIAN [321] (*).
A, Molécule d'anticorps.
B, Molécule d'antigène.

ANTIGÈNE	MASSE MOLÉCULAIRE DE L'ANTIGÈNE	ANTICORPS	RAPPORT N Anticorps / N Antigène dans la zone d'équivalence	COMPOSITION MOLÉCULAIRE EMPIRIQUE				COMPOSITION moléculaire des composés solubles de la zone d'inhibition
				GRAND EXCÈS D'ANTICORPS	ZONE D'ÉQUIVALENCE		INHIBITION PARTIELLE	
					Excès d'anticorps	Excès d'antigène		
Ovalbumine	42.000	Lapin	10,3	A_5G	A_3G	A_5G_2	A_2G	AG
Ovalbumine	42.000	Cheval	»	A_4G	A_2G	»	AG	AG_2
Ovalbumine couplée à un colorant	42.000	Lapin	9,6	A_5G	A_3G	A_5G_2	A_3G_4	AG_2
Hémoglobine	68.000	»	8,8	»	A_4G	A_3G	»	»
Sérum-albumine	69.000	Lapin	7,3	A_6G	A_4G	A_3G	A_2G	A G
Toxine diphtérique ...	70.000	Cheval	3,6	A_8T (sol^{ble})	A_4G	A_3G_2	AG	AG_2
Sérum-globuline	158.000	Cheval	3,7	»	A_4G	A_3G	»	»
Edestine	310.000	»	1,51	»	A_3G	A_3G	»	»
Thyroglobuline	640.000	Lapin	2,68	$A_{20}G$	A_7G	A_5G	AG	AG_2
Hémocyanine	6.800.000	Lapin	0,68	»	A_6G	A_6G	»	»

(*) Voir aussi [321, 582, 358, 681, 679, 389, 2].

n'étaient pas rigoureusement homogènes. Aussi, a-t-on pu proposer la recherche de l'antigène et de l'anticorps dans le liquide surmontant les précipités pour étudier quantitativement la réaction de floculation spécifique [158, 905, 256].

D. — Réversibilité de la réaction

On sait depuis longtemps déjà que le précipité obtenu dans la zone d'équivalence, s'il est à peu près insoluble dans l'eau physiologique, se redissout le plus souvent assez bien dans une solution un peu concentrée d'antigène [479, 364, 356, 410]. Cette dissolution s'effectue, notamment lorsqu'il s'agit du mélange de sérums antigènes et d'immunsérums correspondants, beaucoup plus aisément à la température de l'étuve (Gengou).

En réalité, il ne s'agit pas d'une simple redissolution du complexe qui s'était précipité : il est plus simple d'admettre que le complexe s'est d'abord dissocié et perd une partie de l'anticorps entrant dans sa constitution. L'anticorps libéré se combine à l'antigène ajouté pour donner de nouveaux complexes solubles. Cette « solubilisation » doit donc faire preuve d'une certaine spécificité; c'est ce qu'a bien montré Demees [179] : le précipité sérum globuline-antisérum homologue se redissout plus facilement dans une solution de la même sérum globuline que dans une solution de sérum albumine de même espèce ou de sérum globuline d'une espèce différente. L'anticorps manifeste donc une tendance prononcée à se répartir également sur la totalité de l'antigène présent (Bordet).

On a même pu proposer d'étudier la composition des floculats spécifiques en agitant les flocons dans une série de mélanges d'antigène et d'anticorps en proportions différentes, et en observant pour quel mélange la dissociation est la plus faible (Brown [104]) (*).

(*) C'est ce qu'on appelle le procédé γ (il existe en effet des procédés α et β, voir p. 96). Duncan [216] a trouvé que cette technique donnait des résultats entièrement superposables à ceux du procédé β.

Parfois cependant, les agrégats ne peuvent être remis en solution par apport supplémentaire d'antigène [161, 99, 864].

La réversibilité de la réaction spécifique (*) peut d'ailleurs être très facilement mise en évidence : nous avons signalé comment Heidelberger [378] avait pu isoler la précipitine antipneumococcique en traitant simplement les floculats par une solution un peu concentrée de chlorure de sodium.

Ramon a étudié, dans les précipités toxine diphtérique-antitoxine de Cheval, le déplacement du poison microbien par l'anatoxine [762]. De ces expériences, il résulte que la réversibilité est d'autant plus grande que le complexe avait été plus long à se former : pour déplacer de sa combinaison à un anticorps floculant lentement, une dose mortelle de toxine, il faut cinq fois moins d'anatoxine que la quantité nécessaire pour déplacer cette même dose mortelle d'un complexe formé avec un anticorps floculant rapidement.

La réaction antigène-anticorps montre au contraire, parfois, des exemples d'irréversibilité remarquables : on connaît le phénomène de Danysz [161] (**) : à un certain volume de sérum, on ajoute, en une fois, une dose de toxine telle que le mélange soit atoxique; si on recommence l'expérience dans les mêmes conditions, mais en ajoutant, à intervalle, la toxine par fractions, le mélange final présente une certaine toxicité. Si les réactions étaient parfaitement réversibles, le résultat final ne dépendrait pas de la manière dont les deux constituants ont été mis en présence. Ici encore, d'ailleurs, on observe une réversibilité partielle, car le

---

(*) Voir aussi [623].

(**) Il est préférable de donner à ce phénomène le nom d'effet « Bordet-Danysz ». Bordet avait signalé en 1900 [82], à propos de la fixation de l'alexine, que la quantité maximum de globules qu'un volume donné de sérum hémolytique frais peut lyser, varie selon que les hématies sont ajoutées au sérum, en une ou plusieurs fois. Selon cette seconde façon d'opérer, les premiers globules introduits absorbent plus d'hémolysine que la lyse n'en exige, de sorte que le liquide, vite épuisé, n'agit plus sur les hématies ultérieurement ajoutées.

mélange toxique de l'expérience précédente perd sa nocivité avec le temps [356, 371, 372].

Le phénomène de Danysz se retrouve aussi dans l'étude des précipitines. Si l'on mélange à 1 cm^3 d'antigène des doses variables d'anticorps, et qu'un moment après on ajoute dans tous les tubes de la série 1 cm^3 supplémentaire d'antigène, la zone d'équivalence se produit pour une quantité d'anticorps supérieure à celle de la zone d'équivalence du système où l'anticorps aurait été ajouté d'emblée à 2 cm^3 d'antigène [5, 839].

E. — Action de différents facteurs sur la composition du précipité

1° *Action des électrolytes*

Une concentration saline importante, de l'ordre de 2 N, inhibe complètement les réactions de précipitation [876, 283, 498]. Des concentrations plus faibles, de l'ordre de 0,2 N, retardent considérablement les réactions [221]. Cependant, pour la normalité, la réaction existe encore [167].

La quantité d'azote dosable dans le complexe est moindre quand la concentration saline augmente [378]. Schmidt [838] a étudié le rôle de différents anions dans l'inhibition de la réaction toxine-antitoxine diphtériques. Par ordre d'efficacité, ces ions se classent ainsi :

$$ClO_4 > SCN > ClO_3 > NO_3 > Br > CO_3 > SO_4 > Cl > NO_2 > F$$

Marrack et Smith [590] ont montré que les flocons obtenus avec des solutions de concentration saline habituelle se redissolvent dans des solutions salines concentrées. Ici encore, certains ions sont plus actifs que d'autres.

Notons qu'en l'absence de sels, la toxine ne flocule plus en présence de l'antitoxine correspondante [266, 590]; néanmoins, la première phase, l'accolement antigène-anticorps, a lieu.

Cependant, lorsqu'on s'en tient à des variations modérées de la concentration saline (0,06 à 0,15 N), on n'observe pratiquement pas de variations dans le taux du floculat fourni par une réaction de précipitation spécifique.

2° *Action du pH*

Le rôle du *p*H n'est pas moins important que celui de la concentration saline. Les réactions de précipitation sont cependant possibles dans une gamme de *p*H assez étendue, de 5 à 9 (Michaelis [608]) ou même de 4,5 à 9,5 (Mason [599]).

En dehors de ces limites, la combinaison antigène-anticorps, quand elle a lieu, donne des composés solubles. Des flocons toxine-antitoxine, mis en suspension dans une solution aqueuse de NaCl N/100, commencent à se disperser quand on sort de la zone *p*H 4 — 9 [839], et à *p*H 3, la solution est parfaitement limpide. Ramon [745] avait d'ailleurs noté depuis longtemps la solubilisation des floculats dans l'ammoniaque.

Lorsqu'on se maintient au voisinage de la neutralité (*p*H 6,6 à 8), le taux du précipité est tout à fait constant, qu'il s'agisse d'un système toxine-antitoxine [590] ou protéine-anticorps homologue [373, 374].

Rappelons enfin que le *p*H du milieu ne varie pas au cours de la réaction de précipitation [862].

3° *Action de la température*

Mis à part le rôle accélérant escompté, la température n'a que peu d'effets sur l'abondance du précipité [382, 267]. Parfois, cependant, les floculats sont moins abondants à 37° C. qu'à 0° C. [364, 371, 372] : les précipités obtenus à froid se dissolvent partiellement quand on les soumet à une douce température. Ils réapparaissent à froid.

4° *Action des protéines sériques non spécifiques*

On connaît le rôle « protecteur » des protéines dans les réactions colloïdales. On peut penser que des protéines sans marque immunologique spéciale peuvent cependant modifier par leur présence les réactions de précipitation spécifique.

En réalité, des résultats assez contradictoires ont été publiés sur ce sujet. Pour certains, en présence de protéines sériques banales, les flocons obtenus sont plus abondants; dès 1912, Dean [163] montrait que la CO_2^- globuline (*) du sérum de Cobaye augmentait le degré de précipitation, en présence d'excès d'antigène. Marrack et Smith [591] ont mis en valeur un rôle analogue pour le sérum de Lapin normal. Le sérum de Cheval augmente par sa présence la dilution limite de l'anticorps antipolyosidique donnant encore une précipitation visible [864]. On retrouve des faits analogues en ce qui concerne les agglutinines [722] : la dilution de l'anticorps, effectuée avec un sérum sanguin normal (**), et non avec le sérum physiologique classique, élève le titre en hémoagglutinines. Le facteur responsable de ce phénomène n'existe pas à la naissance dans le sérum et n'apparaît que vers le sixième mois.

Dans d'autres cas, au contraire, on ne peut mettre en évidence aucune action des protéines sériques non spécifiques. Dean *(loc. cit.)* ne trouve aucun pouvoir favorisant quand l'antigène du système précipitant n'est pas en excès. Marrack et Smith [590] montrent que le sérum de Cobaye ou d'Homme ne modifie pas la précipitation de la toxine diphtérique par le sérum homologue, même dans la zone d'excès d'antigène.

(*) On appelle CO_2-globulines les protéines obtenues par dialyse du sérum contre de l'eau saturée en gaz carbonique. Voir le premier chapitre de notre partie expérimentale.

(**) Ne possédant naturellement pas lui-même de propriétés agglutinantes.

On peut même observer une réactivité moindre en présence d'éléments non spécifiques, si l'on se trouve dans la région d'excès d'anticorps [864].

5° *Action de différentes substances non spécifiques*

De très nombreuses substances gênent ou empêchent la formation du précipité spécifique. Dès 1911, Landsteiner [498] attirait l'attention sur le saccharose et sur le glucose qui, à une concentration suffisante, diminuent beaucoup la masse du précipité obtenu. On peut même arriver à une inhibition complète [206, 472]. De même, certains produits, comme le 309 F (*), à partir d'une certaine concentration, empêchent complètement la réaction de floculation [472]. On pense que ces substances agissent en formant des couches qui viennent s'adsorber sur les éléments spécifiques en présence et masquer leurs « motifs » immunologiques.

L'urée, au contraire, même à une concentration importante, n'exerce aucun effet [498].

II. — VITESSE DE FLOCULATION

Nous venons de voir que si l'on fait varier les proportions relatives d'antigène et d'anticorps, le volume et la composition du précipité varient eux aussi. On observe également des différences importantes dans la vitesse d'apparition des agrégats spécifiques.

Ces particularités ont conduit à proposer des méthodes de titration des immunsérums, basées sur la mesure des temps de floculation.

A. — Méthodes de mesure

1° *Primofloculation de Ramon*

La méthode de floculation de Ramon [746] est la première en date. Dans ses premiers travaux, cet auteur ne s'occupait

(*) Moranyl (205 Bayer, Germanine).

que du système toxine diphtérique-antitoxine de Cheval, mais, dans des communications ultérieures, il a pu généraliser ce procédé et l'appliquer au dosage des toxines et antitoxines tétaniques [766], staphylococciques [772, 774, 775] et, récemment, à celles du groupe de la gangrène gazeuse [767].

Le principe de la méthode de Ramon consiste à ajouter à une même quantité d'antigène (toxine) des quantités décroissantes d'antisérum. Le volume total n'est donc pas exactement le même dans tous les tubes, mais cependant les différences sont peu marquées, car la proportion de sérum employée par rapport au volume de toxine (volume qui, lui, est constant) est assez faible. On note le tube dans lequel la floculation s'effectue le plus rapidement. Ce tube correspond à un mélange exactement neutre : son contenu, injecté sous la peau d'un animal, se montre parfaitement atoxique. Le liquide surnageant le précipité ne contient ni toxine, ni antitoxine. Si l'on connaît le titre de la toxine, on peut alors déterminer très facilement et très rapidement la valeur antitoxique de l'immunsérum correspondant.

Plusieurs auteurs ont étudié comparativement la méthode de titration de Ramon et la méthode d'Ehrlich, cette dernière ayant recours à l'expérimentation directe sur l'animal. Les résultats, malgré certaines critiques [868], concordent toujours très étroitement [787, 848, 45, 757, 577].

La pratique de cette réaction a permis de constater que la vitesse d'apparition du complexe spécifique ne dépend pas du titre de l'immunsérum en anticorps, mais reflète en quelque sorte un facteur individuel propre à l'animal immunisé. Un Cheval servant à la production du sérum antidiphtérique fournit toujours une antitoxine qui flocule dans le même temps avec une toxine donnée, et ceci, quel que soit le degré d'immunisation [834, 576]. Le nombre, l'intervalle, le volume des injections ne semblent avoir aucune importance. Au contraire, si l'on soumet à la même série d'inoculation du même antigène un lot de Chevaux à réac-

tion de Schick négative, et un deuxième lot à réaction positive, la floculation est constamment plus rapide avec le sérum des Chevaux du premier groupe. La vitesse de floculation serait donc en rapport avec certaines qualités des sérums, acquises ou seulement développées sous l'influence de l'immunisation occulte qui se manifeste par la réaction de Schick négative [758].

La vitesse de floculation d'un immunsérum traduit ce qu'on appelle son « avidité ». On peut constater que la vitesse de combinaison *in vitro* à l'antigène correspondant est proportionnelle à la vitesse de neutralisation *in vivo*, c'est-à-dire au pouvoir curatif. L'avidité traduit donc l'aptitude de l'anticorps à se combiner à l'antigène. La dissociation du complexe, comme nous l'avons déjà signalé, est d'autant plus aisée à réaliser que le sérum est moins avide [835, 762].

2° *Proportions optima de Dean et Webb*

La méthode de titration de Ramon s'effectue avec des quantités constantes d'antigène.

Etudiant la réaction sérum de Cheval-antisérum de Lapin, Dean et Webb, en 1926 [170], ont indiqué une autre méthode de titration des sérums précipitants, la « méthode des proportions optima ». Contrairement à la précédente, cette technique emploie des quantités constantes d'anticorps; à des volumes égaux de précipitine, on ajoute des quantités décroissantes de l'antigène correspondant sous forme d'un égal volume d'une solution de dilution croissante (*). On opère ainsi à volume constant.

On observe, ici aussi, que pour certaines proportions des deux réactifs, proportions « optima », la floculation se fait plus rapidement. Dans le liquide surmontant le précipité le premier apparu, on ne peut déceler ni antigène, ni anticorps [158, 215, 411, 905]. On a donc une zone de neutralité;

(*) Le mode opératoire a été légèrement modifié par Boyd [86]. Voir aussi [701].

ceci n'est d'ailleurs pas vrai pour la totalité des systèmes précipitants examinés, mais cependant les précipités obtenus pour les proportions optima contiennent, en gros, le même rapport $\frac{\text{anticorps}}{\text{antigène}}$, quelles que soient les concentrations employées [90, 91]. Si, par exemple, on obtient la floculation la plus rapide, pour un immunsérum dilué au 1/5, avec un antigène dilué au 1/200, quand le même immunsérum sera dilué au 1/10, la dilution d'antigène correspondant aux proportions optima sera 1/400.

3° *Comparaison des deux méthodes*

Les auteurs anglais, à la suite de Marrack [5], réservent le nom de procédé α à la technique de titration à anticorps constant (Dean et Webb), la floculation à antigène constant (Ramon) étant alors désignée sous le nom de procédé β.

Chacune de ces deux méthodes nous fournit un optimum, que l'on peut donc appeler aussi « optimum α » et « optimum β ». Y a-t-il correspondance entre ces deux optima ? C'est ce que nous allons examiner.

Notons tout d'abord qu'il est parfois assez difficile d'appliquer, pour les comparer entre eux, les deux procédés à un même système immunologique. Examinons par exemple le couple toxine diphtérique-antitoxine de Cheval à l'aide du procédé β. Comme l'immunsérum contient, à volume égal, beaucoup plus d'unités antitoxiques que la toxine ne contient d'unités toxiques, si l'on veut diluer l'antigène, il faudra diluer encore plus l'antisérum. Dans ces conditions, les réactions seront assez lentes. Au contraire, les sérums de Lapin antiprotéine, qui manifestent une grande avidité et supportent donc mieux les grandes dilutions, seront plus aptes à comparer les deux méthodes.

Plusieurs auteurs ont étudié la question [902, 215, 903, 613, 905, 989, 155]. Ils ont en général trouvé des différences entre les deux optima. Très récemment, Boyd a repris ces

travaux [86] ; nous allons rapidement passer en revue les résultats auxquels il est parvenu. Cet auteur détermine les temps de floculation de tous les mélanges possibles d'antigène et d'anticorps, et consigne ses résultats dans un tableau dressé de la manière suivante (voir fig. 6) :

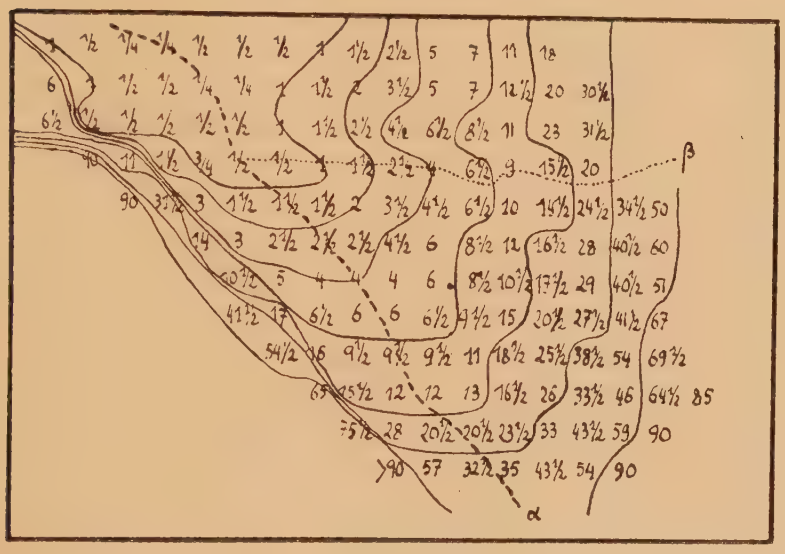


Fig. 6.

Comparaison des procédés α et β. Courbes isochrones. Optima α et β. D'après Boyd [86].

Sur la première ligne horizontale sont représentés les temps de floculation des mélanges pour lesquels la solution d'anticorps a été employée sans aucune modification. Le mélange le plus à gauche correspond à l'antigène pur, celui immédiatement à sa droite à une dilution une fois et demi plus grande, et ainsi de suite en allant de gauche à droite.

Les chiffres de la deuxième ligne représentent les temps de floculation obtenus avec les mêmes dilutions croissantes d'antigène, mais en diluant une fois et demi la solution d'anticorps. En descendant, on aura ainsi les résultats obte-

nus avec des dilutions d'immunsérum de plus en plus importantes.

Les lignes horizontales correspondent donc aux vitesses de floculation mesurées avec un taux d'anticorps constant (procédé α). Dans chacune de ces lignes, il existe un temps de précipitation minimum, c'est l'« optimum α ». Les colonnes verticales, au contraire, pour lesquelles le taux d'antigène est identique dans chaque tube, nous fournissent les résultats du procédé β; ici aussi, certaines proportions relatives correspondent à un temps de floculation minimum (optimum β).

Dans le tableau, Boyd réunit par des tirets les optimum α, par un pointillé les optimum β, et par des traits pleins les mélanges présentant une vitesse de floculation identique (courbes « isochrones »).

Nous représentons ainsi, dans un plan, la projection de la surface représentant les variations des temps de floculation en fonction des deux variables : concentration en antigène et concentration en anticorps. Puisque nous opérons avec des dilutions croissantes, nous aurons en réalité les logarithmes des concentrations réelles.

Boyd a pu ainsi étudier plusieurs systèmes précipitants dont les anticorps provenaient soit de Lapins, soit de Chevaux.

L'optimum α est toujours nettement marqué. Très souvent, au contraire, l'optimum β est beaucoup moins accusé. La ligne réunissant les optima α est voisine d'une droite inclinée à 45°, ce qui est bien conforme à la règle des proportions optima. Celle qui joint les optima β est souvent très irrégulière.

En examinant l'allure des lignes isochrones, Boyd a pu classer les différents anticorps en deux groupes :

a) *Anticorps du type R.* — Le minimum β est difficile à observer. C'est le cas de la majorité des sérums de

Lapin (*). Les lignes isochrones ont alors le type suivant (fig. 7).

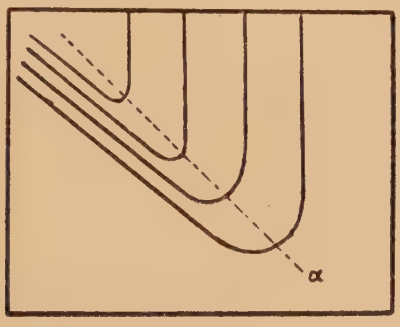


FIG. 7.

Sérum du type R, Un seul optimum.
D'après BOYD [86].

b) *Anticorps du type H.* — Les deux optima sont assez nets (fig. 8). Ces courbes s'observent surtout avec des immunsérums de Chevaux (**).

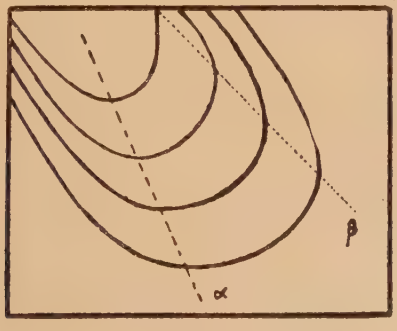


FIG. 8.

Sérum du type H. Deux optima.
D'après BOYD [86].

Dans ce dernier groupe, les deux optima sont parfois très rapprochés, comme dans le système toxine-antitoxine

(*) En anglais, **R**abbit.
(**) En anglais, **H**orse.

diphtériques (fig. 9). Dans ce cas particulier, on s'explique que les proportions optima que l'on obtient par les deux procédés soient très voisines [613] ou tout au moins pas très éloignées [914].

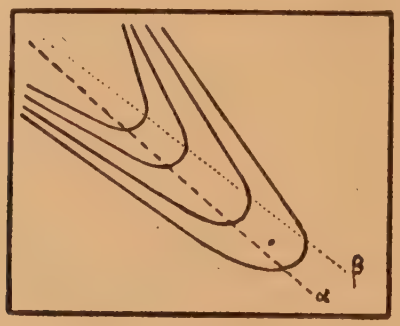


FIG. 9.

Sérum du type H extrême.
Deux optima voisins.
D'après BOYD [86].

Nous sommes donc en possession d'un procédé graphique qui nous donne, d'une manière assez longue, mais simple, des renseignements sur le type de l'anticorps étudié (*).

Nous verrons bientôt la manière dont on peut interpréter ces différences dans les temps de floculation. Mais, auparavant, examinons l'influence de quelques facteurs sur la vitesse de floculation.

B. — ACTION DE DIFFÉRENTS FACTEURS SUR LA VITESSE DE FLOCULATION

Nous n'insisterons pas ici sur le rôle de la concentration saline [837, 838] ni du *p*H [110] sur la vitesse de floculation. Nous avons déjà parlé de l'influence de ces différents facteurs en étudiant la composition du précipité (voir p. 90 et 91).

(*) BOYD vient de décrire encore un nouveau procédé de mesure de la vitesse de floculation [94].

1° *Action de la température*

La température a une action accélérante très nette, et il est important, lorsqu'on étudie la vitesse de floculation d'un système immunologique, d'opérer toujours à une température constante. On travaille habituellement au bain-marie électrique, entre 37° et 42° C., à température constante. Pour des températures plus élevées, l'action accélérante vient interférer avec la dénaturation des molécules protéidiques par la chaleur. Cette dénaturation a pour effet de diminuer l'affinité réciproque des constituants en présence et tend à allonger le temps de floculation.

Lorsqu'on dispose d'un immunsérum manifestant une grande affinité pour l'antigène homologue, on a intérêt à pratiquer les réactions à une température inférieure, à la température ambiante par exemple. Les différences entre les temps de floculation seront alors beaucoup plus nuancées.

2° *Influence de l'agitation*

L'agitation accélère elle aussi la vitesse de réaction. Eagle [221] a montré que l'agitation intervenait peu au début de la réaction, mais qu'elle prenait, au contraire, une valeur considérable dès que des agrégats de taille importante commencent à se former. L'agitation permet de réduire de moitié le temps de floculation.

Les courants de convection qui se produisent au sein des mélanges agissent dans le même sens; aussi a-t-on l'habitude [787] de n'immerger dans le bain-marie que la moitié inférieure des tubes où l'on observe les réactions. Pour avoir des résultats comparables, il est donc indispensable que le niveau du liquide soit à la même hauteur dans chaque tube. La verrerie employée devra donc être soigneusement calibrée.

C. — Systèmes non homogènes

En pratiquant des réactions de précipitation spécifiques, selon le procédé α ou β, il arrive parfois que la floculation

la plus rapide ne se produise pas dans un seul tube, comme nous l'avons vu jusqu'ici, mais dans deux ou plusieurs mélanges non contigus [906, 904].

La courbe des temps de floculation en fonction des différentes proportions d'antigène et d'anticorps ne présente habituellement qu'un minimum (fig. 10). Dans le cas envisagé, la courbe sera beaucoup plus accidentée et comprendra, par exemple, deux minima (fig. 11).

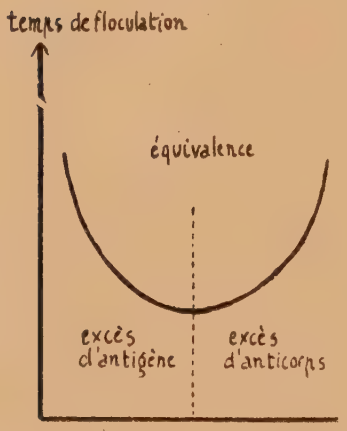


Fig. 10.

Temps de floculation dans un système homogène.
Une seule zone d'équivalence.

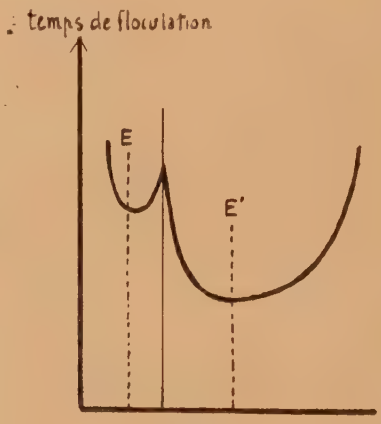


Fig. 11.

Temps de floculation dans un système hétérogène.
Plusieurs zones d'équivalence.

De même, la courbe des teneurs en azote protéidique des différents précipités, dressée selon la technique d'Heidelberger, se présentera non plus sous forme de courbe en cloche, mais sous forme de courbe à plusieurs maxima (Ando [21]).

Nous avons alors affaire à des systèmes non homogènes, comme ceux que l'on obtient souvent en prenant comme antigène un sérum total. Les différentes fractions protéidiques de ce sérum jouent le rôle d'antigènes distincts et donnent lieu à la formation d'autant d'anticorps différents. Lorsqu'on étudie *in vitro* cette réaction sérum-antisérum, on

se trouve en réalité en présence de plusieurs systèmes précipitants qui vont interférer. Si ces systèmes ne présentent pas exactement les mêmes proportions optima, ce qui arrive le plus souvent, leur étude globale donnera lieu à plusieurs optima de précipitation. Le nombre de ces optima donnera le nombre minimum d'antigènes élémentaires présents dans le mélange ayant servi à l'immunisation.

Le dénombrement des antigènes présents dans un milieu complexe peut encore se faire grâce à une technique immunochimique très élégante, décrite récemment par Oudin [672]. On avait déjà remarqué [827], lorsqu'on pratique des réactions de précipitation spécifique avec la technique de l'anneau (voir p. 58), que si la concentration en antigène est très grande par rapport à celle des anticorps homologues, le précipité ne se produit pas à l'interface, mais sensiblement au-dessous. On retrouve ici le phénomène d'inhibition de la méthode de Dean et Webb.

Dans certains cas, on pouvait observer deux ou même plusieurs anneaux (Goldsworthy [311]). Certains auteurs avaient cru voir là des phénomènes de précipitation rythmique analogues aux anneaux de Liesegang (*) [49, 782, 709, 461, 105]. Oudin interprète, au contraire, ces anneaux d'une manière tout à fait différente.

La technique qu'il emploie est la suivante : on dépose dans le fond d'un tube ou, mieux encore, d'une étroite cuve à faces parallèles, du sérum additionné d'une faible quantité de gélose. Cette couche est ensuite recouverte de la solution antigénique (**), et l'ensemble est placé dans une pièce à température constante. Il se fait une lente diffusion de l'antigène dans la couche sérique gélifiée (***), et l'on observe l'apparition progressive d'opacités traduisant la précipitation antigène-anticorps.

(*) Au sujet des animaux de Liesegang, voir [521 et 956].

(**) Une technique très voisine avait été adoptée par Brown [105].

(***) Le rôle de la gélose est bien évidemment d'éviter le mélange brutal des deux réactifs et de s'opposer à la sédimentation des précipités.

On photographie l'aspect obtenu au bout d'une dizaine de jours. Si le système étudié était homogène, nous n'aurons qu'une seule couche opaque à quelque distance de l'interface (fig. 12, A). Cette courbe a une limite nette vers le bas. Elle est, au contraire, dégradée vers le haut (inhibition par les fortes concentrations d'antigène). Si l'antigène injecté était hétérogène, l'immunsérum correspondant comportera plusieurs anticorps : on observe alors plusieurs zones d'opacité superposées (fig. 12, B). Ici encore, le nombre de ces zones correspond au nombre minimum d'antigènes. Cependant, deux antigènes différents, donnant naissance à deux anticorps différents, donneront lieu à une zone d'opacité unique si les deux systèmes présentent les mêmes proportions optima.

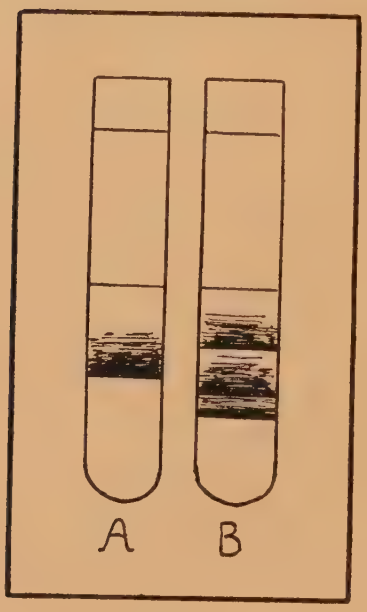


Fig. 12.

Le sérum gélosé (partie inférieure des tubes) est recouvert de la solution antigénique.
A : Système homogène.
B : Système hétérogène.
D'après Oudin [672].

Cette méthode est d'ailleurs susceptible d'applications quantitatives, en cours d'études à l'heure actuelle [673].

CHAPITRE IV

MÉCANISME DES RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION

Nous avons montré comment l'antigène et l'anticorps s'étaient unis l'un à l'autre dans la première phase de la réaction. Nous venons de voir que ce temps initial était bientôt suivi d'un nouveau phénomène : l'insolubilisation du complexe formé.

Avant d'examiner les diverses théories émises sur le mécanisme de la précipitation proprement dite, nous rappellerons certaines conditions essentielles de la solubilité. Des molécules (ou des particules), plongées dans un solvant, sont soumises à deux sortes de forces. D'une part des forces de cohésion tendent à les rapprocher et à les rassembler. D'autre part les forces d'affinité pour le solvant favorisent le maintien d'une phase unique et homogène. Si la cohésion l'emporte sur l'affinité pour le solvant, le corps dissous précipite.

Avec des molécules de grande taille, ou avec des micelles, les antagonismes entre cohésion et affinité varient d'une région à l'autre de la particule. Il en résulte que les modes et les vitesses d'agglomération peuvent être différents suivant la face ou le côté de la molécule (Dervichian [187]).

I. — THÉORIE D'EHRLICH

C'est Ehrlich qui, le premier, émit une hypothèse sur la nature et le mécanisme des réactions immunologiques. Le grand mérite de cet auteur est d'avoir ouvert le chemin à l'interprétation physicochimique des réactions spécifiques. Malheureusement, Ehrlich admettait en principe certaines lois que nous savons fausses aujourd'hui. Il pensait, par exemple, que l'union entre l'antigène et l'anticorps ne pouvait se faire qu'en proportions invariables, les deux réactifs se comportant l'un envers l'autre comme un acide fort et une base forte. Proposée au début du siècle, cette théorie ne pouvait déjà rendre compte de tous les faits alors connus. En voici un exemple emprunté à Bordet [1]. Appelons équivalent de toxine la dose minimum mortelle pour un Cobaye de 250 grammes. L'équivalent d'antitoxine est le volume de sérum qui neutralise exactement un équivalent de toxine. Si la théorie d'Ehrlich était exacte, un mélange contenant 100 équivalents de toxine et 99 équivalents d'antitoxine devrait contenir une seule dose mortelle de poison pour le Cobaye. Or l'expérience montre que ce mélange est inoffensif. Pour tuer un Cobaye, il faut employer une quantité de sérum bien moindre, 75 équivalents d'antitoxine environ : le mélange ainsi obtenu est loin d'avoir les 25 doses mortelles qu'il devrait théoriquement renfermer. Il semble, en somme, que les premières doses de sérum ajoutées neutralisent beaucoup plus de toxine que les dernières. Ehrlich, qui considérait la fixité de composition du complexe antigène-anticorps comme un axiome, avait été conduit pour expliquer un tel phénomène à édifier des hypothèses attribuant une complexité extrême aux antigènes et aux anticorps (*).

(*) On trouvera dans le traité de Bordet [1], p. 614, les détails sur ces notions anciennes de toxone, prototoxine, etc.

II. — THÉORIE D'ARRHENIUS

Quelques années plus tard, Arrhenius [27] et ses collaborateurs [28, 579] appliquaient aux réactions immunologiques la loi d'action de masse de Guldberg et Waage et expliquaient les quelques résultats quantitatifs alors connus par les lois classiques de la chimie. Ils assimilaient la réaction antigène-anticorps à la neutralisation d'une base faible (ammoniaque) par un acide faible (acide borique) (*) ou à l'estérification d'un alcool, réactions entièrement réversibles, qui aboutissent à un équilibre dépendant des concentrations relatives des deux réactifs.

Il resterait donc dans un mélange toxine diphtérique-antisérum de Cheval, une fraction de poison libre, même en présence d'un excès d'antitoxine. Ceci expliquerait pourquoi certains mélanges, inoffensifs pour certaines espèces, tuent certains animaux particulièrement sensibles au poison microbien.

Il n'est cependant pas évident, à priori, que la loi d'action de masse, bien démontrée lorsqu'il s'agit de petites molécules, puisse s'appliquer aux systèmes colloïdaux que l'on rencontre en immunologie. De plus, nous avons vu que les réactions antigène-anticorps sont loin de présenter une réversibilité complète, d'autant plus qu'une grande partie des réactifs s'insolubilise sous forme de flocons (**). Enfin, l'hypothèse d'Arrhenius conduit à admettre, comme celle d'Ehrlich, qu'antigène et anticorps se combinent selon un rapport unique et immuable.

Pour expliquer le phénomène d'inhibition par excès d'antigène, Arrhenius admettait cependant l'existence possible de deux complexes de composition différente, l'un d'entre

---

(*) La courbe de neutralisation de la toxine par l'antitoxine a la même allure hyperbolique que celle de la neutralisation de l'ammoniaque par l'acide borique.

(**) La loi de Guldberg et Waage ne s'applique qu'en présence d'une phase unique.

eux étant soluble. Ceci ne permet pas toutefois d'expliquer la large gamme de proportions dans lesquelles peuvent s'unir les deux agents antigène et anticorps [161, 263].

Lorsqu'on cherche enfin à appliquer cette théorie aux résultats quantitatifs précis obtenus au moyen de méthodes absolues, la concordance avec la loi d'action de masse n'apparaît plus [358].

III. — THÉORIE DE BORDET

C'est Bordet [83] qui, le premier, élabora une théorie susceptible d'expliquer facilement l'union en proportions variables. Contrairement à Ehrlich, cet auteur supposait que les forces entrant en jeu dans la combinaison antigène-anticorps n'étaient pas de nature chimique, mais de simples forces d'adsorption. Cette distinction, encore valable au moment où Bordet exposa la première fois ses idées, a perdu, à l'heure actuelle, beaucoup de sa force puisque l'on sait maintenant qu'il n'y a, en réalité, aucune différence fondamentale entre les réactions chimiques ordinaires et les phénomènes d'adsorption (*). Toutes les réactions chimiques entre grosses molécules, dont la surface possède la majeure partie des groupements réactionnels, se comporteront donc comme des phénomènes d'adsorption, et suivront les mêmes lois (Fowler [272]).

Bordet remarqua l'analogie que présentent, avec la précipitation des substances colloïdales, les phénomènes d'agglutination et de précipitation spécifiques, notamment en ce qui concerne l'influence des électrolytes. La combinaison spécifique se ferait par adsorption d'une couche d'anticorps à la surface de l'antigène; la quantité d'anticorps ainsi adsorbée pourrait être très variable, et il y aurait toute une

(*) Pas plus qu'il n'en existe entre les valences primaires et les valences secondaires (ou résiduelles), c'est-à-dire entre les forces qui créent les liens chimiques réunissant les atomes et les liens de cohésion associant les molécules.

gamme de transition entre l'antigène pur et l'antigène complètement saturé. L'insolubilisation a lieu parce que l'anticorps ainsi adsorbé devient sensible à l'action floculante des électrolytes. Nous avons déjà signalé que, dans l'eau pure, la liaison antigène-anticorps se reproduit encore, mais n'est pas suivie de précipitation.

Anderson et Stanley [19], étudiant au microscope électronique le virus de la Mosaïque du Tabac en présence de l'immunsérum homologue, ont trouvé que les molécules d'anticorps forment une couche de 225 Å d'épaisseur (*) autour de la particule du virus : ceci implique que la molécule d'anticorps soit implantée perpendiculairement sur la surface de l'antigène, comme l'avaient déjà supposé Hooker et Boyd [91] et Marrack [587]. Des travaux récents [90, 409, 91, 587, 427, 358] laissent penser que la couche d'anticorps adsorbée n'est d'ailleurs pas toujours continue.

Cependant, les explications fournies par Bordet ne nous permettent pas de comprendre pourquoi certains haptènes, composés chimiques relativement simples et insensibles à l'action des électrolytes, peuvent néanmoins donner des complexes insolubles avec les anticorps [496, 691].

Comment expliquer, dans le cadre de cette théorie, les phénomènes de zone, l'inhibition observée en présence d'un excès de l'un des constituants ?

Les molécules d'antigène et d'anticorps possèdent des groupements hydrophiles (ou lyophiles) qui sont en général les fonctions polaires, et des groupements hydrophobes (ou lyophobes) représentés par les fonctions apolaires. Si la combinaison spécifique se fait par union des groupements polaires, l'affinité pour le solvant est masquée, les forces de cohésion interviendront seules et le complexe précipitera.

Considérons, par exemple, le procédé β (Ramon) à antigène constant. Au fur et à mesure que, dans la série de

(*) Ce qui correspond bien à la longueur de la molécule d'anticorps (Neurath [643]).

tubes, la concentration en anticorps augmente, le complexe, centré par une molécule d'antigène, sera de plus en plus riche en anticorps (théorie des proportions variables). Les fonctions polaires hydrophiles de l'antigène seront donc progressivement neutralisées et la floculation de plus en plus facile : la vitesse de précipitation ira en augmentant. A partir d'un certain point, la combinaison, composée en majeure partie d'anticorps, aura tendance à acquérir les caractères de solubilité de ce dernier. Si l'anticorps est peu soluble (euglobuline de Lapin), la solubilité du complexe sera faible et l'on observera la précipitation très loin dans la zone d'excès d'anticorps. Si, au contraire, l'anticorps est hydrophile (pseudoglobuline antitoxique de Cheval), on obtiendra rapidement des complexes hydrophiles, donc solubles, quand la proportion d'anticorps ira en augmentant. Dans ce dernier cas, la précipitation passe par un maximum et la zone de floculation est relativement étroite; les proportions optima déterminées par la mesure du temps de floculation ne correspondent pas toujours à la neutralité, le complexe répondant à l'équivalence stricte étant plus soluble que des complexes moins riches en antitoxine.

L'optimum du procédé α (Dean et Webb) est encore plus aisé à interpréter. Quand l'antigène est en faible quantité, il n'y a pas assez de centres d'agrégation pour avoir la floculation la plus rapide, bien que dans cette zone, avec les sérums de type R, les molécules d'antigène soient complètement recouvertes d'anticorps et manifestent le plus une tendance à s'insolubiliser. La quantité d'antigène croissant, le nombre des centres d'agrégation augmente aussi, mais, en même temps, la proportion d'anticorps disponible pour chaque molécule d'antigène est plus faible : les complexes formés seront donc de moins en moins hydrophobes, donc hydrophiles. On entre alors dans les zones d'inhibitions, partielle d'abord, complète ensuite. L'optimum α sera le point où il existe un assez grand nombre

de centres d'agrégation de complexes suffisamment hydrophobes.

La théorie de Bordet, pour expliquer la deuxième phase de la réaction antigène-anticorps, ne fait appel à aucun élément de spécificité du complexe primitivement formé. L'insolubilisation résulte simplement des rapports physico-chimiques entre ce complexe et le milieu dans lequel il baigne.

Ces hypothèses ont été reprises et plus ou moins modifiées par différents auteurs.

Marrack [5] suggère que l'insolubilisation résulte de modifications de la globuline anticorps qui entre pour une grande part dans la composition du complexe et qui en occupe la surface. Il rapproche l'inhibition de la floculation par les fortes concentrations salines de l'absence de précipitation, dans les mêmes conditions des protéines dénaturées (*) (Chick et Martin [658]). Les mêmes sels, dans les mêmes limites de concentration, dissolvent les protéines dénaturées par la chaleur et les flocons du complexe toxine-antitoxine diphtériques [971]. Eagle soutient des idées analogues [220] : l'anticorps, étalé en lame mince à la surface de l'antigène, se dénature et devient moins soluble (**).

Les groupements polaires de l'anticorps seraient dirigés vers l'antigène, tandis que les groupements lyophobes, tournés vers le milieu extérieur, diminueraient l'affinité du complexe pour le solvant aqueux. S'il en était ainsi, les propriétés électrophorétiques des flocons devraient être celles d'un composé de type paraffinique, et non celles de protéines comme l'expérience le montre.

Le fait que, par dissociation, on peut récupérer l'anticorps non modifié n'est pas un obstacle à sa dénaturation dans le complexe : on sait que, dans certains cas, la dénaturation des protéines peut être réversible [645].

(*) Voir aussi à ce sujet [23, 645].

(**) On sait, en effet, depuis le travail initial de Devaux [193], que l'étalement en lame mince des protéines les dénature et les insolubilise totalement.

Les protéines dénaturées se présentent ordinairement sous une forme fibrillaire. Or, Atsbury [32], examinant aux rayons X des complexes antigène-anticorps, n'a pu mettre en évidence une modification de la forme globulaire initiale des protéines constitutives.

En fait, point n'est besoin d'admettre une dénaturation de l'anticorps pour expliquer la diminution d'affinité du complexe pour l'eau. Marrack [5], modifiant légèrement la théorie de Bordet, en arrive aux conclusions suivantes : quand les molécules d'anticorps sont unies à l'antigène, les groupements polaires, dont dépend normalement la solubilité de la globuline-anticorps, sont juxtaposés (fig. 13, A) et s'attirent l'un l'autre, au lieu de capter des molécules d'eau. Seuls les groupements polaires de la surface libre extérieure peuvent se lier au solvant. Si ces groupements sont insuffisants pour maintenir le complexe en solution, les complexes vont floculer quand leur potentiel de surface tombera au-dessous d'un certain niveau critique (*).

IV. — THÉORIES DE MULTIVALENCE MUTUELLE

Les hypothèses que nous venons d'examiner ne font intervenir aucune force immunologique spécifique dans la formation des agrégats insolubles, au cours de la deuxième phase de la réaction antigène-anticorps.

A. — Théorie de Marrack

Marrack [5], rompant avec les idées émises au préalable, a proposé une théorie qui reste encore, avec quelques modifications, la base de nos hypothèses sur le second temps de la précipitation spécifique. Pour cet auteur, l'insolubilisation est moins due à la perte d'affinité pour l'eau qu'à l'attraction mutuelle des complexes formés au cours de la première phase.

(*) Voir [781, 445].

La théorie est fondée sur la notion de « multivalence mutuelle », c'est-à-dire de la polyvalence à la fois de l'anticorps et de l'antigène. Nous avons déjà eu l'occasion de parler de la valence de l'anticorps (voir p. 52), valence relativement variable d'ailleurs selon les auteurs. La multivalence de l'antigène est plus généralement acceptée; elle est aussi plus évidente : le polyoside du pneumocoque du type III est un polymère d'acide aldobionique; les groupements déterminants sont donc obligatoirement répétés un grand nombre de fois. De même, les azo-protéines synthétiques ne forment de précipité avec l'anticorps que lorsqu'elles renferment un nombre suffisant de groupements hapténiques par molécule : Hooker et Boyd [407] ont montré qu'il faut au moins 1 p. 100 d'arsenic dans les antigènes préparés avec de l'acide p-aminobenzène arsinique. Ces mêmes chercheurs ont pu mettre en évidence un antigène pouvant s'unir à plus de cent molécules d'anticorps [92, 415].

Si l'on admet donc, avec Marrack, cette multivalence mutuelle, on peut supposer que les différentes molécules d'antigène et d'anticorps sont unies entre elles par leurs groupements spécifiques, formant ainsi un réseau (*) assez grossier (fig. 13, B); chaque molécule d'antigène, par exemple, fait le lien entre deux molécules d'anticorps et vice-versa. Il y a donc une alternance, plus ou moins régulière d'ailleurs, de molécules des deux agents, d'où le nom d' « alternation hypothesis » qu'on a proposé (Hooker et Boyd [415]).

Les groupements polaires sont dissimulés à l'intérieur du réseau, où ils prennent part aux liaisons intermoléculaires. Seuls les groupements polaires superficiels de l'agglomérat peuvent fixer des molécules d'eau et maintenir l'ensemble

(*) C'est donc la théorie du Réseau (Lattice theory). Pauling [685] préfère employer le terme « charpente » (Framework) qui n'évoque pas une si grande régularité; le mot « réseau » a, par ailleurs, une signification très précise en cristallographie.

en solution. Dès que la taille du complexe est suffisante, ses groupements hydrophiles efficaces ne sont plus assez nombreux par rapport à son volume : il y a floculation.

En présence d'un excès d'antigène, on aura de petits agglomérats formés de quelques molécules (fig. 13, C) ou

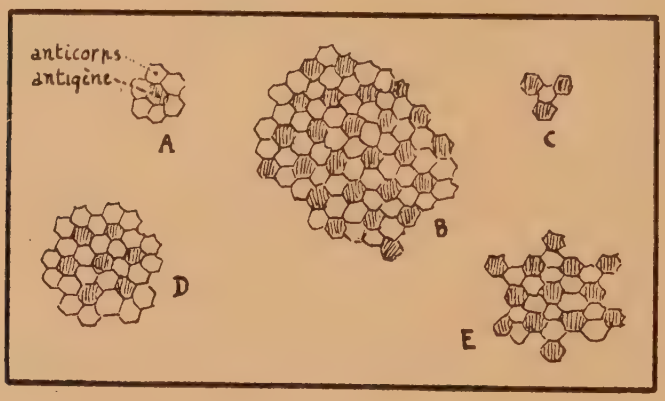


Fig. 13.

Schémas de constitution des complexes spécifiques.

A : Grand excès d'anticorps.
B : « Réseau » de la zone d'équivalence.
C : Grand excès d'antigène.
D : Excès d'anticorps.
E : Excès d'antigène.

D'après Marrack [5].

bien encore des complexes relativement importants (fig. 13, E). Mais, dans ces deux cas, il n'y aura pas assez de molécules d'anticorps pour réunir ces amas en masses plus importantes susceptibles de floculer. Inversement, nous aurons, dans la zone d'excès d'anticorps, des formations telles que A (fig. 13) ou D (fig. 13), dont la solubilité dépendra de la nature et de l'hydrophilie de la globuline anticorps. On retrouve encore ici la distinction entre sérums du type R ou H.

Nous ne nous attarderons pas sur l'explication du phénomène de Bordet-Danysz, évidente avec le schéma de Marrack.

En somme, dans cette « lattice theory », il n'y a plus de raisons de distinguer les deux phases habituelles des réactions antigène-anticorps, puisque c'est le même mécanisme qui préside à l'union des deux agents puis ensuite à leur insolubilisation.

Avons-nous des arguments en faveur de cette théorie ? Si les liens qui unissent les maillons élémentaires du réseau sont des forces spécifiques, lorsqu'on étudie le mélange de deux systèmes immunologiques précipitants différents, les flocons obtenus doivent appartenir, les uns au premier système, les autres au second; il ne doit pas y avoir de flocons mixtes. Il est difficile, en réalité, de réaliser l'expérience avec des systèmes précipitants. Aussi a-t-on fait appel à des mélanges d'agglutinines différentes et aux antigènes correspondants. Nous avons déjà insisté sur l'analogie profonde des phénomènes d'agglutination et de précipitation.

Topley, Wilson et Duncan [925] ont constaté que des bactéries intestinales et des pneumocoques en suspension dans le même liquide s'agglutinaient séparément lorsqu'on ajoutait au milieu un mélange des immunsérums homologues. De même, Wiener et Herman [970] obtinrent des agglutinats homogènes avec un mélange de pneumocoques du type I, d'hématies humaines et d'anticorps correspondants. Bien mieux encore, ces mêmes auteurs identifient des paquets mixtes de pneumocoques type XIV et d'hématies humaines par addition à la suspension globulaire et bactérienne de sérum antipneumococcique type XIV. Cet antisérum donne des réactions d'agglutination croisée avec les globules rouges de l'Homme et cette variété de pneumocoques. Cette dernière expérience élimine l'objection suivante que l'on avait faite aux précédentes : la formation d'agrégats homogènes est due seulement à l'attraction spécifique entre bacilles semblables.

Le rôle de l'antigène dans la formation du réseau est bien mis en évidence par une expérience d'Heidelberger

[358] : des pneumocoques du type I, agglutinés par un excès d'anticorps, sont lavés jusqu'à ce que les eaux de lavage ne contiennent plus d'anticorps. Remis en suspension, ces germes s'agglutinent à nouveau par addition de pneumocoques du type I ou d'une solution du polyoside correspondant. L'expérience est au contraire négative avec des pneumocoques du type II ou leur polyholoside.

B. — Théorie d'Heidelberger

Cette théorie de multivalence mutuelle, exposée par Heidelberger, est assez voisine de la précédente. Les hypothèses de cet auteur sont les suivantes [358] :

1° L'antigène G et l'anticorps A sont chimiquement et immunologiquement multivalents l'un pour l'autre, c'est-à-dire que chacun d'eux possède deux ou plusieurs groupements susceptibles de réagir avec l'autre;

2° Bien qu'à un même antigène puisse correspondre plusieurs anticorps (*), ceux-ci sont supposés se comporter de la même manière et peuvent être assimilés à une substance unique;

3° La réaction antigène-anticorps consiste en une série de réactions bimoléculaires successives qui ont lieu avant que ne se produise la précipitation;

4° A chaque instant, la loi d'action de masse s'applique, ce qui fait que la quantité de produits formés est proportionnelle à la concentration des substances réagissantes.

On aura ainsi, tout d'abord :

$$G + A \rightleftarrows GA,$$

puis, lorsqu'on se trouve dans la région d'excès d'anticorps :

$$GA + A \rightleftarrows GA.A$$

$$GA + GA \rightleftarrows GA.GA.$$

(*) Voir p. 44.

La réaction se poursuit de manière analogue (*) :

$$GA.A + A \rightleftarrows GA.A.A$$
$$GA.GA + A \rightleftarrows GA.GA.A$$
$$GA.A + GA.A. \rightleftarrows GA.A.GA.A$$
$$GA.A. + GA.GA \rightleftarrows GA.A.GA.GA.$$
$$GA.GA. + GA.GA \rightleftarrows GA.GA.GA.GA... \text{ etc.,}$$

jusqu'à ce que les particules soient assez volumineuses pour être insolubles et s'éliminer ainsi de la réaction (**). La composition moyenne du précipité dans cette zone d'excès d'anticorps est voisine de GA_2.

Dans la zone d'équivalence, au contraire, on observe surtout des intermédiaires de type GA.GA, la composition moléculaire des flocons se rapprochant de $(GA)_n$. Dans la région d'excès d'antigène, il se forme des complexes G_nA, contenant une molécule d'antigène de plus que le dernier composé insoluble. Bien entendu, il faut se représenter l'assemblage des molécules dans l'espace et non dans un plan.

(*) La théorie mathématique de ces réactions a été récemment étudiée [392, 459].

(**) On trouve des réactions chimiques très simples qui procèdent d'un mécanisme comparable. Nous en citerons deux exemples qui permettent d'envisager des analogies intéressantes avec la formation des précipités spécifiques [687].

Les ions cyanure agissent sur les sels d'argent en provoquant un précipité de cyanure d'argent. L'ion Ag a la propriété de former deux liaisons de covalence avec l'ion cyanure : il s'attache donc deux ions cyanure, un de chaque côté. L'ion cyanure forme également deux liaisons de covalence, l'une sur le carbone, l'autre sur l'azote. L'accolement des deux ions bicovalents, argent et cyanure, va donner naissance à de longues chaînes où les ions alternent. Ces chaînes se groupent ensuite côte à côte pour donner le précipité de cyanure d'argent. Ce précipité se dissout d'ailleurs dans un excès de cyanure, tout comme le complexe antigène-anticorps est soluble dans un excès d'antigène.

Le Bleu de Prusse se forme de même par action d'ion ferreux sur l'ion ferrocyanure; ce dernier contient six groupements attachés à un ion central ferrique; chacun de ces six groupements peut s'attacher à un ion ferreux, et l'ion ferreux forme deux liaisons avec six groupements cyanure. Ce processus conduit à la formation d'un réseau cubique s'étendant dans les trois dimensions, réseau qui constitue justement le précipité de Bleu de Prusse.

C. — Théorie de Pauling

Pauling [685] admet aussi l'existence du « réseau » dans la formation de floculats spécifiques. Pour cet auteur, si l'antigène est polyvalent, l'anticorps, au contraire, n'est que divalent : ceci suffit cependant à expliquer l'existence d'agrégats de taille illimitée. Dans la région d'équivalence, toutes les valences, celles de l'antigène comme celles de l'anticorps, sont mutuellement bloquées (fig. 14). Différents

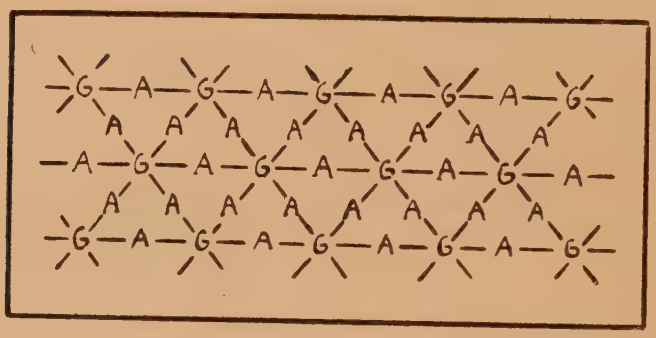


Fig. 14.

Portion d'un précipité antigène-anticorps où tous les groupements sont saturés. Dans cet exemple, l'antigène a une valence de 12; six valences sont représentées dans le plan de la figure, trois relient cette couche à l'assise supérieure analogue, trois à l'assise inférieure. D'après Pauling [685].

arrangements géométriques correspondent aux diverses valences possibles de l'antigène. Mais ces représentations correspondent souvent à un rapport $\frac{\text{anticorps}}{\text{antigène}}$ bien plus grand que celui que l'on constate expérimentalement. On aurait alors, dans les régions d'excès d'antigène ou d'excès d'anticorps, des agglomérats de structure moléculaire moins condensée (fig. 15).

Les théories d' « alternance » ont encore été récemment confirmées par l'étude de la précipitation des immunsérums par des substances chimiques simples agissant comme

haptènes [736-741, 693-698]. Certaines expériences sont particulièrement démonstratives [694] : on injecte à des Lapins une azoprotéine contenant des groupements hapténiques R; on obtient un sérum anti-R. De même, un deuxième groupe d'animaux, injectés avec une azoprotéine

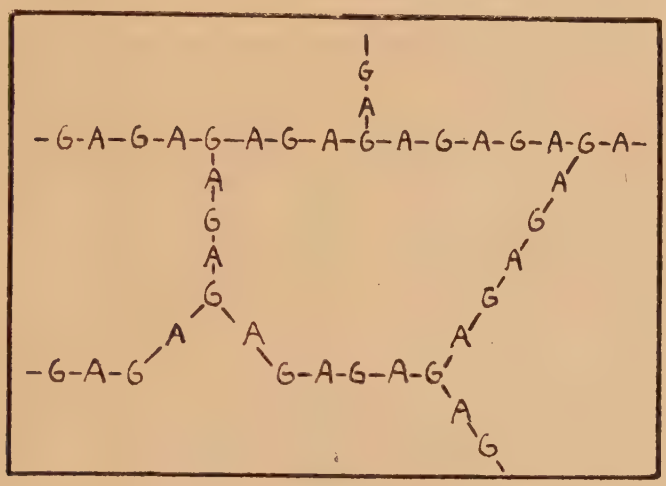


Fig. 15.

Fragment de précipité dans la région d'excès d'antigène.
D'après Pauling [685].

contenant des groupements X, fournit un sérum anti-X. Si RX est une substance ne contenant qu'un seul groupement R et qu'un seul groupement X par molécule, ce dihaptène ne donne de précipité ni avec le sérum anti-R, ni avec le sérum anti-X, mais seulement avec un mélange des deux.

Ceci s'explique très bien en admettant la nécessité de la multivalence mutuelle pour obtenir la floculation. La substance RX, qui ne contient qu'un seul groupement R, est univalente par rapport aux anticorps anti-R; elle ne peut donc pas former un assemblage avec eux. Il en est de même avec le sérum anti-X. Cependant, on peut prévoir, et Pauling l'a vérifié expérimentalement, que RX peut inhiber la précipitation du sérum anti-R ou du sérum anti-X par les subs-

tances simples polyhapténiques ou par les azoprotéines correspondantes. La substance RX est dihapténique et divalente pour le mélange des deux immunsérums, chaque molécule pouvant s'unir à la fois à une molécule d'anticorps anti-R et à une molécule d'anticorps anti-X : on aura donc, dans ce cas, apparition d'un précipité (*).

D. — Théorie de Dervichian et Grabar

En France, la théorie de la multivalence mutuelle a été reprise sous une forme un peu différente par Dervichian et Grabar [188, 321]. A la base de leurs hypothèses se trouve la représentation de la structure moléculaire des protéides, proposée par Dervichian [183, 185]. Cet auteur, à la suite d'études sur les lames minces de protéines [181, 182], a été conduit à assigner à ces substances une structure dorsi-ventrale, confirmant ainsi les observations de Devaux [194] sur la mouillabilité des lames d'albumines collées sur le verre.

En solution, la molécule protéidique se présente, d'après ces auteurs, sous forme d'un ellipsoïde aplati que l'on peut assimiler à un disque d'épaisseur à peu près constante, disque dont le diamètre dépend du poids moléculaire de la protéine. Ce disque comprend deux feuillets formés par les chaînes peptidiques plus ou moins repliées. Les groupements lyophobes soudent entre eux les deux feuillets par solvatation réciproque, tandis que les groupements lyophiles émergent sur les faces libres. Ces deux faces, planes, sont identiques tant par la nature et le nombre des groupements polaires que par leur arrangement réciproque, et présentent une symétrie ternaire.

D'après ces conceptions, l'anticorps sera nécessairement polyvalent, sa valence minimum étant de six. La juxtapo-

(*) Dans ces expériences, le rapport moléculaire $\frac{\text{anticorps}}{\text{antigène}}$ est de 0,7; avec l'antigène bivalent employé, ceci conduit à une valence moyenne de 2,8 pour la molécule d'anticorps dans le précipité.

sition de certains résidus d'aminoacides et leur disposition spatiale constitue un motif spécifique pouvant se lier électivement à une région de l'antigène qui lui correspond stéréochimiquement. Le motif se répétera nécessairement trois fois sur chaque face de la molécule, et l'on peut passer d'un motif à l'autre par une rotation de 120° autour de l'axe de symétrie.

La théorie de Dervichian et Grabar nous permet de concevoir qu'entre certaines limites, l'antigène et l'anticorps

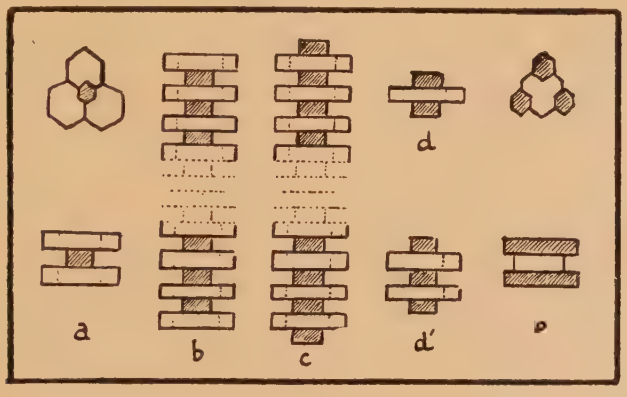


Fig. 16.

Schémas de constitution de complexes spécifiques.
D'après Grabar et Dervichian [321].

pourront s'unir en proportions quelconques. En effet, lorsqu'on se trouve en présence d'un grand excès d'anticorps, seules les molécules d'antigène seront en mesure de satisfaire à la fois toutes leurs valences. On aura donc des complexes de type A_6G (fig. 16, a). Lorsque la quantité d'antigène croît par rapport à la quantité d'anticorps, les molécules d'antigène pourront se fixer sur les faces du composé A_6G; on aura ainsi formation de complexes moins riches en anticorps, de type $(A_3G)_n A_3$ (fig. 16, b). Suivant la quantité d'anticorps en excès, il y aura plus ou moins de l'une ou l'autre combinaison. Les complexes seront terminés

par des molécules d'anticorps, mais dans la région de léger excès d'antigène, on aura des complexes très voisins (fig. 16, c) terminés au contraire par des molécules d'antigène. Ces derniers empilements sont donc plus riches en antigène et correspondent à la composition $(A_2G)_nG$. Le même raisonnement nous suggère l'existence, dans la zone d'excès d'antigène, de composés A_3G_2 (d) et, dans la zone d'inhibition complète, d'un complexe A_6G (fig. 16, e).

Les caractères de solubilité des agrégats s'expliquent d'une manière identique à celle à laquelle nous avons fait allusion à propos de la théorie de Marrack : seule la représentation géométrique des précipités est différente. Ce sont surtout les gros agrégats qui vont floculer les premiers, les forces de cohésion mutuelles de leurs molécules étant plus grandes que leur affinité pour l'eau. En somme, on peut dire que « ce n'est pas un composé insoluble qui précipite, mais plutôt le précipité qui constitue le composé » (Dervichian). Dans cette théorie encore, nous voyons qu'il n'y a pas lieu de faire de distinction fondamentale entre les deux phases des réactions de précipitation : la seconde n'est que la continuation de la première et s'effectue avec les mêmes forces spécifiques.

V. — CRITIQUE DES THÉORIES DE MULTIVALENCE MUTUELLE

Le groupe d'hypothèses précédent reposait en définitive sur deux points fondamentaux :

— la formation d'un réseau (ou tout au moins d'empilements) ;

— le rôle primordial des forces d'attraction spécifique ;

chacune de ces deux propositions a été critiquée.

Les défenseurs de la théorie de Marrack pensent que la possibilité de formation d'un réseau est nécessaire et suffisante à obtenir l'agrégation. Ils ne tiennent pas compte de

l'affinité des divers groupements pour l'eau. La présence dans un composé d'au moins deux groupements pouvant assurer la liaison spécifique suffira donc à le rendre apte à précipiter les anticorps. De simples haptènes, répondant à ces conditions, manifesteront un pouvoir floculant même si leurs dimensions moléculaires sont faibles. Pauling [691, 693], étudiant les antisérums vis-à-vis d'antigènes possédant le groupement phénylarsinique, trouve que les anticorps sont précipitables par des composés chimiques simples si ces derniers possèdent au moins deux groupements hapténiques.

Ces expériences n'ont pas toujours été confirmées : dans des conditions très voisines, Hooker et Boyd [407, 369], avec une azo-caséine à base d'acide arsanilique, n'obtiennent pas de précipitation par l'antisérum correspondant avec des composés contenant cependant six ou sept groupements arsaniliques par molécule. Théoriquement, rien ne s'oppose à ce que de tels composés multivalents entrent dans la constitution d'un réseau. D'ailleurs, la floculation apparaît avec un nombre de groupements spécifiques plus grand. Ces auteurs obtiennent des résultats analogues avec toute une série de haptènes différents [413, 415, 87]. Haurowitz arrive aux mêmes conclusions [347]. Pauling [693] estime que ces expériences n'ont pas été faites dans des conditions favorables à la précipitation : on peut très bien ne pas observer de floculation avec un sérum peu avide, alors que le sérum d'un animal plus fortement immunisé en donne. Heidelberger et Kendall [372], travaillant avec un sérum de Lapin antipneumococcique, n'obtiennent aucun floculat avec les produits d'hydrolyse du polyholoside, qui contiennent encore de nombreux groupements déterminants et peuvent produire une inhibition spécifique de cet antisérum. On constate, au contraire, la précipitation avec ces mêmes produits d'hydrolyse et un sérum antipneumococcique de Cheval. Cette expérience met bien en évidence le rôle de la nature même de l'anticorps [86].

Si un haptène divalent ne donne aucun précipité avec

l'anticorps homologue, on peut supposer [685] qu'il ne possédait pas assez de groupements spécifiques sur sa surface pour donner lieu à un véritable réseau. On doit donc avoir seulement de longues chaînes où anticorps et haptènes alternent; les chaînes, maintenues en solution par les groupements polaires qu'elles possèdent, doivent conférer au liquide une biréfringence d'écoulement marquée. Hooker et Boyd [415], utilisant un système répondant à ces conditions, n'ont pu mettre en évidence cette biréfringence.

Dans un système où l'antigène possèderait les mêmes caractéristiques physicochimiques que l'anticorps (taille, solubilité, etc.), l'hypothèse de la multivalence mutuelle nous conduit à prévoir l'existence de zones d'inhibition symétriques, aussi bien dans la région d'excès d'antigène que dans celle d'excès d'anticorps. Haurowitz [348], à l'aide d'un tel système, obtient bien des composés solubles par excès d'antigène, mais n'observe pas d'inhibition dans la région d'excès d'anticorps.

Des objections se sont aussi élevées contre les théories faisant intervenir uniquement des forces spécifiques dans la deuxième phase du phénomène de floculation.

Boyd [2] nous signale un fait souvent remarqué par Landsteiner : les précipités et les agglutinats ont souvent tendance à se coller aux parois du tube à essais dans lequel ils se trouvent. Les complexes seraient donc doués d'une sorte d'adhésivité non spécifique : ceci rendrait donc vraisemblable la liaison des agrégats primitifs sans l'intervention de forces sérologiques spécifiques (*).

L'un des meilleurs arguments en faveur du rôle de la liaison spécifique au cours de la deuxième phase des réactions antigène-anticorps est l'obtention d'agrégats distincts dans les systèmes mixtes (voir p. 115). En fait, ces expériences n'ont pas toujours été confirmées. Abramson [13] obtient une agglutination mixte d'hématies et de bacilles

(*) Voir [405].

de Friedlander. Hooker et Boyd [412] observent des amas contenant à la fois des globules rouges d'Homme et des hématies de Poulet (celles-ci étant reconnaissables grâce à leur noyau). Landsteiner (*), avec la ricine, note des faits analogues.

L'agglutination mixte de particules aussi volumineuses n'exclut cependant pas le mécanisme suivant : la combinaison antigène-anticorps se ferait bien par des liaisons spécifiques, mais bloquerait certains groupements polaires de la surface, ce qui entraînerait une agrégation non spécifique.

Si ces forces spécifiques étaient vraiment les seules à entraîner l'insolubilisation des complexes, la vitesse de deux systèmes sérologiques indépendants ne devrait pas être affectée par leur mélange, s'il respecte les concentrations respectives : les deux antigènes, enrobés de l'anticorps homologue, ne devraient se combiner qu'à des éléments identiques à eux-mêmes. Tout au plus, pourrait-on observer un retard dans la réaction. En fait, on constate expérimentalement que la vitesse d'un tel système double est plus grande [412, 217] ; l'augmentation est justement celle qu'on aurait eue en supposant que la deuxième phase de la réaction soit complètement aspécifique (**).

Toutes ces difficultés ont amené de nouvelles hypothèses. Dervichian [186], se fondant sur l'analogie de structure micellaire des solutions de protéines et des solutions de savons [184, 189], a modifié sa théorie initiale. Il pense que l'attraction spécifique des groupements déterminants homologues ne suffit pas à expliquer la formation de volumineux complexes. Il se produirait, en outre, un accolement, non spécifique, des faces latérales des anticorps. Comme nous l'avons déjà vu, dans la zone d'excès d'anticorps, les composés primitivement formés résulteraient de la sou-

(*) [4], p. 253.

(**) Consulter également [156].

dure de trois molécules d'anticorps à une molécule d'antigène.

L'accolement peut se poursuivre dans le plan. Le pavage hexagonal constitue ainsi des feuillets continus d'anticorps (fig. 17). L'ensemble répond à la formule A_3G. En présence d'une quantité plus importante d'antigène, on obtient de

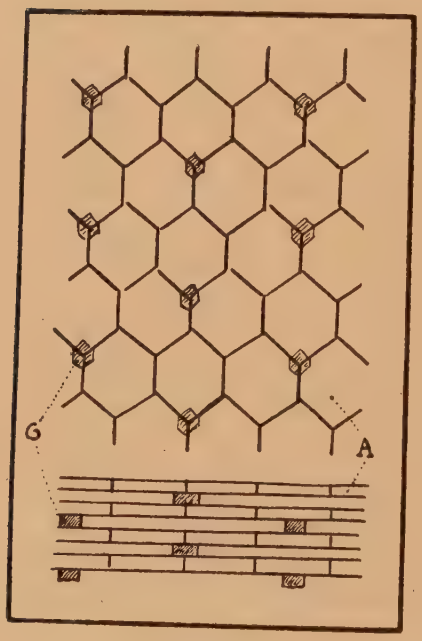


FIG. 17.

Structure du complexe spécifique A_3G. D'après DERVICHIAN [186].

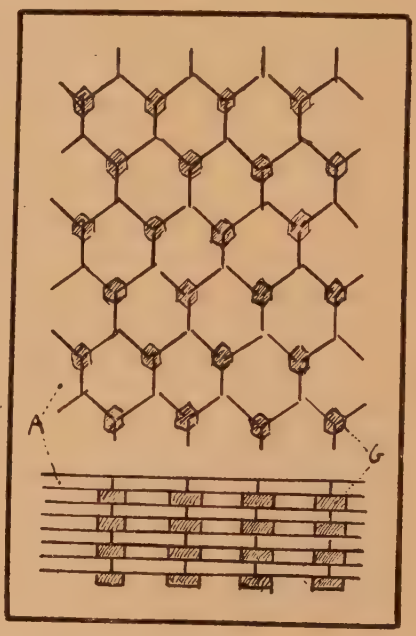


FIG. 18.

Structure du complexe spécifique AG. D'après DERVICHIAN [186].

même un complexe à deux dimensions, mais de composition différente AG (fig. 18). Les liaisons spécifiques par les faces ionisées des molécules peuvent entrer aussi en jeu : il se forme alors un empilement d'édifices élémentaires plans (*). Les deux modes de liaison, celui qui accole les

(*) Les complexes spécifiques sont loin d'avoir la régularité cristalline des fig. 17 et 18. L'organisation moléculaire de ces édifices, comme celle de nombreux produits biologiques, doit être comprise suivant le schéma de DERVICHIAN : ordre à petite distance, désordre à grande distance [187 bis].

molécules d'anticorps dans chaque feuillet et celui qui les associe dans leur empilement, se favorisent mutuellement pour édifier l'ensemble du complexe. De très faibles quantités d'antigène peuvent donc faire apparaître un précipité abondant : quelques molécules soudent, par leurs groupements déterminants, des quantités d'anticorps beaucoup plus importantes, ces anticorps ayant déjà tendance à s'accoler les uns aux autres par leurs faces latérales.

Dans la zone de grand excès d'antigène, il y a assez de

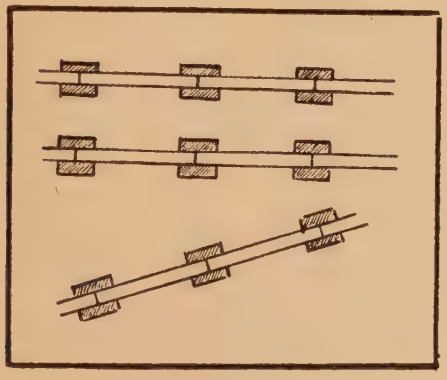


FIG. 19.

Structure du complexe spécifique. Grand excès d'antigène. D'après DERVICHIAN [186].

molécules G pour saturer complètement les deux faces du feuillet de A (fig. 19). Les feuillets ainsi formés n'auront aucune tendance à s'empiler : on n'observe donc pas de précipité, mais simplement un accroissement de la viscosité (voir p. 75). Les associations solubles d'anticorps et d'antigène apparaîtront donc dès que la proportion de 1 G pour 1 A sera dépassée : l'empilement ne peut plus se faire dès qu'une molécule d'antigène se fixe sur une face d'un édifice plan AG.

Ces hypothèses sont tout à fait conformes aux résultats expérimentaux qui indiquent bien l'apparition de composés

solubles dès que la composition de l'association est plus riche en antigène que AG.

Nous ne pouvons insister sur l'interprétation très simple du phénomène de Danysz et sur l'explication du phénomène de zone que nous fournit cette nouvelle théorie de Dervichian.

Nous devons signaler que les bases mêmes de cette théorie ont été fortement critiquées. L'étude de la diffraction des rayons X par les protéines n'a pas permis de confirmer la structure feuilletée de leur molécule [706].

Boyd [2, 87] a proposé une nouvelle hypothèse de la réaction de précipitation spécifique, la théorie de l' « occlusion ». Cet auteur pense que la floculation serait due beaucoup plus à une diminution de l'hydrophilie du complexe qu'à l'attraction mutuelle des molécules entrant dans la réaction. Cette perte d'affinité pour l'eau proviendrait de la neutralisation réciproque des groupements polaires de l'antigène et de l'anticorps, et de l'empêchement stérique concomitant des autres fonctions hydrophiles de l'anticorps, empêchement stérique dû à la proximité de la molécule antigénique. Les molécules d'anticorps, unies à la molécule d'antigène, sont étroitement rapprochées et empiètent littéralement les unes sur les autres. Plusieurs de leurs groupements polaires, bloqués par des liaisons non spécifiques, ne peuvent plus attirer les molécules du solvant aqueux. Il y aurait, en somme, une véritable élimination de ces groupements, une « occlusion » mécanique. Le complexe spécifique ne posséderait plus assez de fonctions polaires lyophiles pour se maintenir en solution.

Les défauts, mais peut-être aussi le mérite de la théorie de Boyd, c'est de rester assez vague et neutre. La nature même des forces produisant l'accolement, puis la précipitation n'est pas précisée. Cette hypothèse n'élimine pas du tout la formation d'un réseau où les molécules sont alternées.

Tout récemment, Teorell [911], se basant sur la poly-

valence de l'antigène opposée à la monovalence de l'anticorps, et s'appuyant sur la loi d'action de masse, a donné une série de relations permettant de calculer la quantité de précipité formé et le rapport anticorps/antigène dans le floculat. Ces données s'accordent assez étroitement avec les résultats expérimentaux.

Nous voyons donc, en conclusion, qu'il n'existe encore, à l'heure actuelle, aucune théorie complètement satisfaisante ni exempte de critiques sur le mécanisme de la réaction antigène-anticorps.

C'est d'ailleurs justement le nombre et la variété des hypothèses envisagées qui feront naître de nouveaux travaux expérimentaux; ceux-ci permettront peut-être, dans l'avenir, de fonder des conceptions plus certaines.

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Nos travaux personnels ont porté sur trois points principaux qui feront l'objet de trois chapitres :

1° Nous avons recherché tout d'abord la nature de la fraction protéidique qui supporte les propriétés floculantes du sérum antidiphtérique de Cheval. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence le rôle capital de la technique employée sur la nature même de ces fractions.

2° Nous nous sommes ensuite attaché à préciser le rôle joué par les lipides dans la réaction de précipitation spécifique. Nous avons effectué ces recherches dans deux systèmes différents :

a) Toxine diphtérique-antitoxine de Cheval;

b) Sérum de Cheval-antisérum correspondant de Lapin.

3° Nous avons enfin effectué des recherches sur l'action comparée d'un agent chimique, l'aldéhyde formique, sur l'antigène et sur l'anticorps d'un même système précipitant.

CHAPITRE PREMIER

LOCALISATION DE LA FRACTION PRÉCIPITANTE DU SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE DE CHEVAL.

Nous avons déjà très brièvement rappelé l'existence dans le sérum sanguin de plusieurs fractions protéidiques : euglobuline, pseudoglobuline, albumine.

Avant d'exposer nos travaux sur la localisation de la fraction précipitante du sérum antidiphtérique de Cheval, il est bon de donner quelques précisions sur les constituants protéidiques du sérum sanguin.

I. — GÉNÉRALITÉS : LES CONSTITUANTS PROTÉIDIQUES DU SÉRUM SANGUIN

Dès le milieu du siècle dernier, Panum [677] montrait l'existence dans le sérum d'au moins deux fractions différentes : la « sérum caséine », précipitant par dilution du sérum avec de l'eau distillée, et l' « albumine », qui reste soluble dans ces conditions. Un peu plus tard, Schmidt [843] et Weyl [966], effectuant la dilution avec une eau saturée de gaz carbonique, obtenaient des fractions un peu différentes.

C'est la pratique du fractionnement par les sels neutres qui a permis d'aboutir à la séparation de la « globuline » et de l' « albumine ». Les premières recherches furent effectuées avec le sulfate de magnésium; dès 1859, Denis [180]

différenciait, au moyen de ce sel, la « fibrine dissoute » de la « sérine ». Des résultats très voisins furent obtenus avec le sulfate de sodium, préconisé en 1889 par Homer [403].

Ces deux sels sont encore quelquefois utilisés à l'heure actuelle [428, 510]; la plupart des biochimistes donnent cependant leurs préférences au sulfate d'ammonium. Il fut proposé en 1884 par Michailow [610], puis utilisé par Kauder [454] et par Pohl [721]. Mais c'est surtout Hofmeister [400] qui montra tout l'intérêt de ce produit dans le fractionnement des protéides sériques.

Lorsqu'on ajoute progressivement à un volume donné de sérum sanguin des quantités croissantes d'une solution saturée en sulfate d'ammonium et neutralisée, il se forme un précipité de plus en plus abondant quand la concentration en sel augmente. Au voisinage de la demi-saturation (volume de solution saline égal au volume primitif de sérum), le poids du précipité ne varie plus et, pour obtenir la séparation d'une nouvelle fraction, il faut augmenter beaucoup la teneur en sulfate d'ammonium. Hofmeister donna le nom de *globulines* à la fraction insoluble à demi-saturation en sulfate ammonique, les protéines restant en solution dans ces conditions étant les *albumines*.

La distinction entre albumines et globulines fut encore confirmée par la précipitation à l'aide de solvants organiques, l'acétone en particulier [716].

Cette notion fondamentale conserve encore tout son intérêt aujourd'hui. Les deux fractions correspondent réellement à des espèces chimiques différentes. Certains auteurs [618, 859, 809, 259] ont prétendu obtenir la transformation de l'un des protéides en l'autre, mais leurs travaux n'ont jamais été confirmés [249, 733, 408].

D'ailleurs, leurs caractères physiques sont distincts : poids moléculaire (albumine : 69.000, globuline : 150.000) (*), point isoélectrique (albumine : 4,7, globuline : 6) (**),

(*) [16, 883, 791, 792, 666].

(**) [913, 817, 818, 513].

température de coagulation (albumine : 75° C, globuline : 65° C), caractères de solubilité, diagramme électrophorétique [916, 917]. Leur teneur en aminoacides serait aussi un peu différente [830].

Si la distinction entre albumines et globulines sériques est admise aujourd'hui par tout le monde, la pureté et l'homogénéité de ces fractions est encore une source de controverses. Seul le fractionnement des globulines nous intéressera ici : c'est qu'en effet on ne trouve jamais de propriétés anticorps dans les sérumalbumines.

Burkhardt [13] avait constaté, à la suite de Denis, que le sulfate de magnésium précipite du sérum des protéides insolubles dans l'eau pure, qu'il considérait comme des globulines et des protéides hydrosolubles, qu'il appelait albumines. Reprenant les travaux précédents, Hammarsten [335] put montrer que les protéides hydrosolubles, précipités à l'aide de sulfate de magnésium à saturation, avaient des caractères de globulines. C'est qu'en effet, les globulines ne sont pas toutes solubles dans l'eau pure.

Marcus [585], après s'être débarrassé des protéines s'insolubilisant par dilution aqueuse, put encore obtenir un précipité important par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Les globulines, insolubles dans l'eau pure, sont les *euglobulines,* tandis que celles qui ne précipitent pas par dilution sont les *pseudoglobulines.* Les mêmes fractions peuvent être obtenues en remplaçant la dilution du sérum par la dialyse contre l'eau distillée [744]. On peut aussi séparer dans un premier temps l'ensemble des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, et soumettre ensuite le précipité ainsi obtenu à la dialyse (*).

Fuld et Spiro [287], puis, plus tard, Porges et Spiro [733]

(*) En réalité, la dialyse du sérum total ou la dialyse des globulines préalablement séparées par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ne sont pas rigoureusement équivalentes : la dialyse, non seulement chasse les sels, mais encore fait tendre le *p*H vers l'isoionique moyen des protéides. Dans un cas, on trouve dans la solution les pseudoglobulines et les albumines; dans l'autre, les pseudoglobulines seulement (Machebœuf, cité par Tayeau [895]).

se sont demandés si ces fractions globuliniques ne pouvaient pas être obtenues par précipitation à l'aide du sulfate d'ammonium. Une étude attentive de la courbe de précipitation révèle, en effet, un petit palier correspondant au tiers de saturation en sulfate d'ammonium. Pour ces auteurs, les protéines insolubles à cette concentration saline sont les euglobulines (*), tandis que les pseudoglobulines (*) ne s'insolubilisent qu'entre le tiers et la demi-saturation.

En réalité, il n'y a pas correspondance exacte entre les euglobulines obtenues par dialyse et les euglobulines obtenues par l'action des sels neutres. Freund et Joachim le signalent dès 1902 [279]. Le fait a été confirmé par Ettisch et Sachsse [245] et, tout récemment encore, par Tayeau et Mlle Martin [897]. Comme nous allons le voir maintenant, les expériences que nous avons effectuées sur les immunsérums nous ont amené à des conclusions tout à fait semblables.

II. — TRAVAUX PERSONNELS

Nos expériences ont été effectuées sur du sérum antidiphtérique de Cheval. On sait depuis longtemps déjà que la fonction antitoxique de ce sérum, évaluée *in vivo*, est supportée par la fraction pseudoglobulinique (Seng [856]).

On connaît aussi le pouvoir précipitant des sérums antitoxiques vis-à-vis des toxines correspondantes : dès 1909, Calmette et Massol [114] observèrent, dans le cas du système venin-sérum antivenimeux, que les proportions relatives correspondant à la neutralité exacte étaient les plus favorables à la production du précipité. Quelques années plus tard, Nicolle, Cesari et Debains [653] utilisèrent cette propriété pour évaluer la puissance des sérums antidiphtérique et antitétanique. C'est surtout Ramon, nous l'avons vu, qui mit au point une technique de titrage précis basée sur la primofloculation [746, 750].

(*) Selon la définition de Marcus.

La « précipitine » des immunsérums est-elle la même substance que l'antitoxine ? Les résultats concernant le pouvoir précipitant de l'antitoxine diphtérique isolée du sérum sont assez discordants. Aussi, avons-nous voulu reprendre cette question.

Les sérums antidiphtériques dont nous nous sommes servi au cours de nos différentes expériences, aussi bien dans ce chapitre que dans le suivant, nous ont été fournis par l'Institut Pasteur de Bordeaux, sous forme de sang total. Les animaux étaient immunisés selon la méthode habituelle; la plupart d'entre eux avaient subi une immunisation prolongée.

Après coagulation du sang et rétraction du caillot, nous avons recueilli le sérum puis éliminé, par centrifugation, les quelques éléments figurés qu'il pouvait contenir en suspension. Nous avons toujours opéré sur des sérums frais (*) conservés en glacière, à + 1° C, depuis moins de trois jours; ils n'étaient additionnés d'aucun antiseptique (**).

Nous avons, de préférence, recherché les sérums doués d'une certaine « avidité » et dont les temps de floculation en présence de toxine ou d'anatoxine étaient assez courts.

A. — TECHNIQUES UTILISÉES

1° Titration du sérum antidiphtérique et du pouvoir floculant des différentes fractions sériques

Pour évaluer le pouvoir floculant, nous avons employé une méthode de titration à volume d'antigène constant (« β procedure »), très voisine de celle de Ramon.

Dans une série de tubes à hémolyse de même calibre (***), on

(*) On sait que les sérums vieillis subissent de profondes modifications [173, 888, 894], notamment en ce qui concerne leurs propriétés sérologiques [205, 103].

(**) Les antiseptiques peuvent également amener dans le sérum de nombreuses perturbations [473, 300]. On trouvera dans le troisième chapitre une étude détaillée de l'action de l'un d'entre eux, le formol.

(***) Pour sélectionner des tubes de même calibre, la méthode la plus simple consiste à déposer dans chacun d'eux un même volume de liquide et à ne retenir que les tubes dans lesquels la hauteur atteinte par le liquide est identique.

introduit une même quantité de toxine (*) ou d'anatoxine diphtérique (**). On verse ensuite, au moyen d'une pipette de précision graduée au 1/100e de cm³, des quantités croissantes de sérum antidiphtérique ou de solution protéidique à étudier; on ramène le contenu de chaque tube au même volume avec de l'eau physiologique (***). Ramon, dans sa technique classique, n'opère pas à volume constant. Cela se justifie parfaitement car les doses de sérum sont toujours petites par rapport à la quantité d'antigène et, de ce fait, les variations relatives du volume total sont minimes. Il n'en est plus de même lorsqu'on emploie, non du sérum pur, mais des dilutions plus ou moins grandes d'anticorps et qu'on explore une gamme de concentration plus importante.

On agite chaque tube par deux retournements successifs, en évitant de faire mousser le liquide. Les différents mélanges sont alors portés au bain-marie à 38° C, les tubes étant immergés dans l'eau tiède seulement jusqu'à mi-hauteur de leur contenu. Il apparaît bientôt, dans quelques tubes voisins, un louche qui va en augmentant, et l'on observe attentivement dans quel tube se fait la première floculation, c'est-à-dire l'apparition de flocons visibles à l'œil nu, amenant une hétérogénéité franche dans le milieu et tranchant nettement avec le louche homogène qui existait jusqu'alors.

Cette primofloculation correspond à la neutralité. Il est dès lors facile, connaissant le titre de la toxine et la quantité d'anticorps employée, de calculer le titre antitoxique de la solution essayée.

2° Obtention des diverses fractions globuliniques

a) *Séparation des globulines*

Dans un premier temps, nous avons séparé les globulines des albumines. Nous avons utilisé une méthode au sulfate d'ammonium, inspirée de celle d'Hofmeister [400] et dont on trouvera l'exposé par ailleurs [553, 887, 895].

On verse un volume déterminé de sérum dans un tube à centri-

(*) Nous tenons à remercier Mlle Marg. Faure, Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Paris, qui nous a envoyé, à maintes reprises, des échantillons de ce poison. Ces toxines contenaient souvent quelques gouttes de formol par litre, pour assurer leur conservation; mais ces doses sont nettement insuffisantes pour altérer leur pouvoir toxique ou amoindrir leur avidité.

(**) Chaque fois que cela nous a été possible, nous avons toujours, de préférence, utilisé comme antigène la toxine, qui présente, par rapport à l'anatoxine, une avidité plus grande vis-à-vis du sérum homologue. Les temps de floculation sont donc plus réduits.

(***) En fait, nous introduisons le sérum physiologique avant l'anticorps pour diminuer l'erreur sur le temps zéro.

fuger cylindroconique, puis un volume égal d'une solution saturée en sulfate d'ammonium (*). La solution saline, plus dense, tombe au fond du tube. On homogéinise le milieu en agitant avec une fine baguette de verre. On attend une dizaine de minutes, car l'action précipitante du sulfate d'ammonium n'est pas immédiatement complète. On centrifuge ensuite pendant quinze minutes à 6.000 tours. Les globulines se rassemblent en un culot blanc surmonté d'un liquide jaunâtre limpide qui contient en solution les fractions albuminiques. Ce liquide est éliminé.

Les globulines ainsi obtenues ne sont pas pures ; on les redissout alors dans un volume connu d'eau distillée, puis on les reprécipite une deuxième fois par addition d'une quantité de solution saturée en sulfate d'ammonium égale au volume d'eau distillée employée pour les dissoudre.

Les globulines sont à nouveau recueillies par centrifugation. On répète encore deux fois la même opération; on dissout enfin la fraction protéidique dans de l'eau distillée jusqu'à l'amener au volume désiré. Cette solution de globulines contient du sulfate d'ammonium que l'on peut éliminer par dialyse (voir plus bas). C'est la présence de ce sel qui permet aux euglobulines de rester en solution.

b) *Fractionnement des globulines*

Pour aller plus loin dans la séparation des fractions globuliniques, c'est-à-dire pour séparer les euglobulines des pseudoglobulines, nous avons utilisé trois méthodes :

α. La première technique dérive de celle de Marcus [585]. Elle consiste à soumettre la fraction globulinique globale à la dialyse. Nous avons employé à cet effet de simples tubes de cellophane (**). On obture l'extrémité du tube avec un bouchon de caoutchouc sur lequel on ligature fortement la membrane dialysante; on introduit la solution de globulines et l'on ferme le tube de la même manière qu'à l'autre extrémité. La dialyse est effectuée d'abord pendant quelques heures contre de l'eau froide, puis enfin, pendant vingt-quatre heures, contre de l'eau distillée glacée, fréquemment renouvelée. On arrête l'opération quand on ne peut plus déceler d'ion sulfate dans l'eau contre laquelle on effectue la dialyse. Au début de l'opération, la solution globulinique était parfaitement limpide; on s'aperçoit qu'elle devient bientôt opalescente et qu'il se forme ensuite un précipité : ce sont les euglobulines qui s'insolubilisent, les pseudoglobulines restant en solution.

(*) On vérifie que cette solution saline possède un *p*H de 7. Lorsqu'elle est acide, on la neutralise avec quelques gouttes d'ammoniaque.

(**) British Cellophane L^td^, 17-19 Stratford Place, Oxford Street, London, W. 1.

A la fin de la dialyse, les deux fractions sont recueillies et séparées par centrifugation. Les euglobulines (ED) sont dissoutes dans une quantité connue d'eau physiologique (ClNa à 9 p. 1.000) (*). La solution de pseudoglobulines (PD), dont on mesure le volume, est additionnée de chlorure de sodium, de manière à ce que sa concentration en sel soit également de 9 grammes par litre.

β. La deuxième technique est basée sur les affirmations de Porges et Spiro [733]. La séparation se fait uniquement au moyen de sulfate d'ammonium. La fraction, précipitant entre 0 et 33 p. 100 de saturation en sel, forme l'euglobuline, la pseudoglobuline se séparant entre 33 et 50 p. 100. On opère de la manière suivante : un volume déterminé de sérum est additionné d'un demi-volume de solution saturée en SO_4Am_2 (**). Il se forme un précipité d'euglobuline; après un moment de contact, on le recueille par centrifugation et on le sépare des eaux-mères qui contiennent, elles, les pseudoglobulines et les albumines.

Les euglobulines sont redissoutes dans $2n$ cm³ d'eau distillée puis reprécipitées par n cm³ de solution saline saturée. Après une nouvelle centrifugation, les eaux-mères sont ajoutées aux précédentes. On répète encore deux fois la même opération; après la dernière précipitation, les euglobulines sont dissoutes dans un volume connu d'eau distillée (ES).

Dans les eaux-mères provenant des opérations précédentes, on sépare d'une manière analogue la pseudoglobuline de la sérum albumine en amenant le titre en sulfate d'ammonium de la solution de 0,33 à 0,50 (***). Après lavages, le précipité est dissout dans l'eau distillée (PS).

On est donc en présence d'euglobulines (ES) et de pseudoglobulines (PS) en solution dans de l'eau contenant un peu de sulfate d'ammonium. Nous avons cherché à nous débarrasser de ce sel en effectuant des dialyses.

La fraction euglobuline, contre l'eau distillée, a donné lieu à une précipitation abondante, mais non totale. En effet, si après dialyse on isole le précipité obtenu, on constate que les eaux-mères contiennent encore une notable proportion de protéines, décelables par

---

(*) Il arrive parfois que la solution d'euglobulines ne soit pas tout à fait limpide. On lui rend ce caractère par addition d'une trace de solution diluée d'ammoniaque.

(**) Ce qui correspond au tiers de saturation en ce sel.

(***) Pour connaître le volume X de solution saturée de sulfate d'ammonium que l'on doit ajouter à un volume V d'une solution contenant déjà un certain titre T de ce sel, afin d'obtenir un nouveau titre T' en sulfate d'ammonium, on applique la formule suivante :

$$X = \frac{V\,(T' - T)}{1 - T'}$$

l'acide trichloracétique. La fraction euglobuline de Porges et Spiro n'est donc pas homogène; elle est souillée de pseudoglobulines solubles dans l'eau distillée.

Par dialyse, la solution pseudoglobulinique est devenue trouble, mais par centrifugation, nous n'avons pas pu recueillir un volume appréciable de précipité, et les eaux-mères restaient troubles. La fraction primitive contient donc encore quelques euglobulines, mais en quantité très faible.

Devons-nous alors subdiviser encore la fraction euglobulinique en deux sous-fractions, ou pouvons-nous utiliser directement ces fractions ES et PS malgré leur faible teneur en sel d'ammoniaque ?

Pour répondre à cette question, il fallait connaître l'action du sulfate d'ammonium sur la réaction toxine-antitoxine diphtériques. A ce sujet, nous avons effectué quelques essais, dont nous mentionnerons l'essentiel, avant d'exposer notre troisième technique de fractionnement des globulines.

Action du sulfate d'ammonium sur la réaction toxine-antitoxine

Expérience I

Sérum 55 (14-2-1946) 360 U. A.

Anatoxine R, 40 U. F.

On prépare les mélanges suivants :

Mélange	Sérum 55	Solution saturée en $SO_4 Am_2$	Eau physiologique
I	5 cm³	0 goutte	30 gouttes
II	5 cm³	15 gouttes	15 —
III	5 cm³	20 —	10 —
IV	5 cm³	25 —	5 —
V	5 cm³	30 —	0 goutte

Dans le mélange V se produit un léger louche après quelques minutes; aussi, nous ne l'utilisons pas.

Les différents mélanges sont titrés par l'anatoxine R avec le protocole suivant (floculations à 37° C) :

TUBE N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anatoxine R, en cm³.	2 »	2 »	2 »	2 »	2 »	2 »	2 »	2 »	2 »
Solution d'anticorps (I, II, III ou IV) en cm³	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32
Eau physiologique, en cm³	0,08	0,07	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,00

Les solutions I, II, III et IV présentent toutes la primofloculation dans les tubes 4, 5 et 6. Les temps de floculation, à une minute près, sont tous identiques (vingt minutes).

Nous voyons que la présence de sulfate d'ammonium ne modifie en rien ni la primofloculation, ni le temps de floculation. Il est vrai que la concentration globale en sel neutre du mélange total était faible.

Expérience II

Nous avons voulu nous rendre compte de l'effet de concentrations plus grandes, en additionnant aussi de sels neutres la solution antigénique. Nous effectuons les mélanges suivants (sérum 55, du 18-2-1946, 245 U. A.) :

MÉLANGE	SÉRUM	SOLUTION SATURÉE EN $SO_4(NH_4)_2$ (en cm³)	RÉSULTAT IMMÉDIAT	APRÈS UNE HEURE
I	5 cm³	1,5	Solution claire	Opalescente
II	5 cm³	1,6	Solution légèrement opalescente	Léger précipité
III	5 cm³	1,7	Opalescente	Précipité
IV	5 cm³	1,8	Trouble	Précipité abondant

Comme nous l'avons signalé, l'action du sulfate d'ammo-

nium n'est pas immédiate. Nous ne retenons que le mélange I.

Nous effectuons, d'autre part, le mélange :

Anatoxine ..... 20 cm³,

Solution saturée en $SO_4(NH_4)_2$.. 6 cm³,

qui reste clair, même après une heure de contact (*).

Le protocole de floculation est le suivant :

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8
Antigène, en cm³.....	2	2	2	2	2	2	2	2
Anticorps, en cm³.....	0,25	0,27	0,29	0,31	0,33	0,35	0,37	0,39

Dans les deux systèmes :

Sérum normal — anatoxine normale

Sérum + $SO_4(NH_4)_2$ — anatoxine + $SO_4(NH_4)_2$,

les proportions relatives d'antitoxine et de toxine sont les mêmes dans chaque tube. Pour les deux couples, la primofloculation se fait dans les tubes 4 et 5. L'étendue de la zone de précipitation est identique. En présence du sel, la floculation est un peu plus lente : vingt-cinq minutes au lieu de vingt, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'en dehors de la présence du sulfate, nous avons opéré une certaine dilution.

Nous voyons donc, en conclusion, que la présence de sulfate d'ammonium, surtout en faible concentration, ne gêne en rien la détermination de la primofloculation.

Nous pouvons donc, dans la préparation des euglobulines et des pseudoglobulines, selon Porges et Spiro, utiliser directement les solutions ES et PS, sans dialyse.

γ. Il nous faut encore indiquer la technique que nous avons suivie pour séparer une fraction globulinique connue sous le nom de CO_2 globulines [197].

(*) Cette solution antigénique contient ainsi la même teneur en sulfate d'ammonium que le mélange I.

A 5 cm³ de sérum, on ajoute 95 cm³ d'eau distillée. Il se produit un léger louche; on transvase le mélange dans une éprouvette de faible calibre, et l'on fait barboter de l'anhydride carbonique dans le liquide, ce gaz arrivant au fond de l'éprouvette par un tube de verre effilé. Rapidement, le louche primitif augmente et l'on a bientôt formation d'un précipité. Au bout d'une heure, on recueille ce précipité de *CO_2-globulines* par centrifugation. On le dissout dans l'eau physiologique et on amène le volume total de la solution à 5 cm³. La solution se présente sous l'aspect d'un liquide opalescent qui s'éclaircit partiellement par addition d'une trace d'ammoniaque.

Les eaux-mères neutralisées sont additionnées de 100 cm³ de solution saturée en sulfate d'ammonium. On obtient un précipité que l'on recueille par centrifugation. Il est impossible d'arriver à clarifier totalement par centrifugation, même prolongée, le liquide qui surmonte le précipité. On recueille néanmoins ce dernier et on le dissout dans 5 cm³ d'eau physiologique.

B. — RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

1° Pouvoir floculant des globulines totales

Nous avons effectué quelques expériences avec les globulines totales; les résultats ont toujours été identiques : les globulines ont exactement le même pouvoir floculant que le sérum total. La fraction albuminique en est, au contraire, complètement dépourvue. Voici le détail d'un de nos essais :

Sérum 55 (14-2-1946) 360 U. A.
Anatoxine R, 40 U. F.

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anatoxine, cm³.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Dose, cm³	0,10	0,12	0,15	0,18	0,20	0,22	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,70
I	O	O	L	F	F	F	**F**	F	F	F	L	O
Dose, cm³	0,20	0,24	0,30	0,36	0,40	0,44	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,40
II	O	O	L	F	F	F	**F**	F	F	F	L	O
III	O	O	L	F	F	F	**F**	F	F	F	L	O
IV	O	O	L	F	F	F	**F**	F	F	L	L	O

I, Sérum non modifié.

II, Sérum dilué à moitié avec de l'eau physiologique.

III, Globulines totales en solution physiologique contenant du sulfate d'ammonium (dilution 2).

IV, Globulines totales dialysées, en solution physiologique (dilution 2).

O, Pas de troubles. F, Précipité.
L, Louche. **F,** Primofloculation.

Les vitesses de floculation sont les mêmes pour les trois dernières séries (vingt minutes). Les zones de précipitation sont très voisines. La similitude des séries III et IV nous montre encore le peu d'influence de petites quantités de sulfate d'ammonium sur ces réactions.

2° Pouvoir floculant des fractions globuliniques isolées par dialyse

Nous avons vu comment on pouvait obtenir, à partir du sérum total, des solutions dans l'eau physiologique d'euglobulines et de pseudoglobulines selon Marcus. Nous allons examiner le pouvoir floculant avec notre technique habituelle de précipitation.

Nous avons répété la même expérience sur quatre sérums antidiphtériques différents : nous donnerons seulement ici le compte rendu d'une expérience (sérum 93, du 15-3-1946), les résultats ayant été très analogues dans tous les cas.

Nous sommes parti de 15 cm³ d'immunsérum; après dialyse, le volume de la solution de pseudoglobulines était de 23 cm³; les euglobulines ont été dissoutes dans de l'eau physiologique, le volume étant aussi amené à 23 cm³.

Nous pratiquons une gamme assez étendue de floculation, de manière à pouvoir mettre en évidence même de faibles quantités d'antitoxine; dans chaque tube, le volume total est amené à 2,45 cm³ par addition d'eau physiologique. Les résultats sont notés après trois heures de séjour au bain-marie.

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Toxine A, 35 U. F. (en cm³)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
Dilution d'anticorps (en cm³) ..	0,15	0,17	0,20	0,22	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,35	0,50	1
Euglobulines....	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Pseudoglobulines.	O	L	F	F	F	L	O	O	O	O	O	O

Nous pouvons faire les constatations suivantes :

— La fraction euglobulinique ne contient aucune précipitine;

— La fraction pseudoglobulinique, au contraire, contient presque toutes les unités floculantes du sérum initial. Ce dernier avait un titre de 529 unités antitoxiques. La primofloculation nous indique un titre de $\frac{70 \times 100}{22} = 318$ unités, ce qui donnerait, pour le sérum non dilué :

$$\frac{318 \times 23}{15} = 487 \text{ unités.}$$

Cette baisse, relativement faible, du titre antitoxique s'explique facilement par les pertes inévitables au cours des nombreuses opérations de précipitation et de dialyse que nous avons fait subir au sérum.

— Le temps de floculation de la fraction « pseudo-globulines » est de trente-cinq minutes, alors que celui du sérum initial était de quatorze minutes. Il est donc nettement augmenté.

— Lorsqu'on pratique la réaction de floculation avec le mélange à parties égales des deux fractions (*), on obtient à nouveau la primofloculation dans le même tube. Le temps de floculation n'est guère modifié (trente-trois minutes).

(*) En employant bien évidemment des volumes doubles de la nouvelle solution.

— Dans une seule expérience (sérum 94, du 13-3-1946), nous avons observé un précipité avec le dernier tube de la gamme des euglobulines, pour des proportions correspondant à 35 unités antitoxiques.

Malgré ce dernier résultat, nous pouvons tirer comme conclusion de nos expériences que les euglobulines isolées par dialyse (ED) n'ont aucun pouvoir floculant. Les propriétés précipitantes du sérum sont localisées entièrement dans les pseudoglobulines de dialyse (PD), mais cette fraction, essayée isolément, a un temps de floculation plus long que celui du sérum dont elle provient.

3° Pouvoir floculant des CO_2-globulines

Nous n'avons effectué que deux expériences de ce type, car cette technique de séparation des fractions globuliniques, peu utilisée à l'heure actuelle, nous a semblé dénaturer assez fortement les propriétés précipitantes du sérum antidiphtérique de Cheval (*).

La fraction obtenue par dilution du sérum avec de l'eau distillée et acidification par le gaz carbonique, « CO_2-globuline », ne présente aucun pouvoir floculant. Nous pensions alors retrouver dans les autres globulines une activité précipitante voisine de celle du sérum initial : il n'en est rien. A peine retrouve-t-on dans cette fraction la moitié des unités floculantes du début.

Sérum N°	Unités floculantes		
	Sérum initial	CO_2-Globulines	Globulines restantes
78 (21-2-46)	600	0	270
94 (8-3-46)	275	0	125

(*) Peut-être la dénaturation est-elle due, en partie tout au moins, au moussage de la solution réalisée par l'anhydride carbonique. Voir [14].

4° Pouvoir floculant des fractions globuliniques obtenues par la méthode au sulfate d'ammonium

Dans nos premiers essais, nous avons soumis à la dialyse les fractions obtenues grâce au sulfate d'ammonium, pour nous débarrasser de ce sel. Nous avons ensuite étudié l'influence de ce composé sur la réaction toxine-antitoxine diphtérique (voir p. 143) et constaté que, dans les conditions où nous opérions, son action était négligeable. Nous avons alors employé directement les précipités obtenus par action du sulfate d'ammonium, après les avoir dissous dans l'eau physiologique.

Nous avons, ici encore, étudié le pouvoir précipitant des deux fractions et de leur mélange en mesurant la vitesse de primofloculation et la largeur de la zone de précipitation.

Les euglobulines obtenues par la méthode de Porges ont des propriétés floculantes importantes : si la primofloculation se produit presque aussi rapidement que dans le sérum total, leur teneur en unités floculantes est cependant faible; avec la technique de floculation que nous avons adoptée, la précipitation se fera donc surtout dans les tubes de droite de la gamme.

Nous avons retrouvé dans la fraction ES jusqu'à 25 p. 100 des unités floculantes du sérum initial.

Les pseudoglobulines floculent très lentement; dans deux expériences, nous n'avons même pas pu observer avec elles de floculation nette, mais seulement une forte opalescence. Lorsqu'à la longue la floculation se produit, elle indique souvent une teneur en unités floculantes proche de celle du sérum total.

Voici, rassemblés en un tableau, les résultats d'une de nos expériences (sérum 94, du 11-3-1946).

TUBE N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
TOXINE 35U., CM³	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
ANTICORPS, CM³	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,26	0,30	0,35	0,42	0,50	0,30	0,35	0,50	1
ES	»	»	»	»	O	»	»	O	L	F	**F**	F	F	F	L
PS	O	L	L	F	**F**	F	F	F	L	L	O	O	O	O	O
ES + PS	F	**F**	F	F	F	F	F	L	L	L	O	O	O	O	O

SOLUTIONS	SÉRUM	ES	PS	ES + PS
Temps de floculation (min.) . .	10	15	70	14

Dans cette expérience, nous sommes parti de 20 cm³ de sérum. Le volume de la solution ES est de 20 cm³, celui de la solution PS de 25 cm³.

$$\text{ES contient } \frac{70 \times 1}{0{,}5} = 140 \text{ unités floculantes.}$$

$$\text{PS contient } \frac{70 \times 1 \times 25}{0{,}2 \times 20} = 437 \text{ unité floculantes.}$$

$$\text{EP + ES contient } \frac{70 \times 1 \times 45}{0{,}14 \times 40} = 562 \text{ unités floculantes.}$$

Nous voyons donc que les pseudoglobulines, si elles sont le support des antitoxines, ne floculent bien qu'en présence d'euglobulines.

Nous nous sommes demandé si ces pseudoglobulines PS, mises en présence d'une euglobuline Z (*) de Cheval non immunisé, se comporteraient comme le mélange EP + PS. Il n'en est pas ainsi : l'euglobuline doit être elle-même spécifique.

(*) Isolée elle aussi selon la méthode de PORGES et SPIRO.

Expérience

Sérum 55 (18-2-1946), 245 U.

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anatoxine 40 U., en cm³	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Anticorps, en cm³..	0,20	0,22	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,70	1
E S	O	O	O	O	O	L	F	**F**	F
P S	O	O	O	O	O	F	**F**	L	L
E S + P S	O	O	O	F	**F**	F	F	F	L
Z + P S	O	O	O	O	O	L	**F**	F	L

5° Pouvoir agglutinant des différentes fractions globuliniques

Au cours des expériences précédentes, il nous restait souvent de petites quantités de solutions de différentes fractions globuliniques (ED, PD, ES ou PS), de volume trop peu important pour servir à l'étude de nouvelles réactions de précipitation.

Le sérum de Cheval, normal ou immun, contient une hétéroagglutinine vis-à-vis des hématies humaines. Cette agglutinine, comme tous les anticorps, est une globuline. Nous nous sommes demandé dans laquelle, parmi les fractions protéidiques précédemment isolées, nous pourrions la mettre en évidence.

Observation de l'agglutination

Sur un petit carreau de porcelaine blanche, on dépose III gouttes de la solution protéidique à essayer (*). Avec un vaccinostyle, nous piquons alors le lobule de l'oreille d'un

(*) Cette solution, comme nous l'avons vu, est isotonique.

volontaire (*) ; nous essuyons les premières gouttes de sang, puis nous en prélevons une faible quantité dans une pipette Pasteur. On dépose alors une goutte de ce sang sur la plaque de porcelaine, à côté du liquide agglutinant. Avec un fin agitateur à extrémité mousse, nous mélangeons les deux liquides tandis qu'on met en route un chronomètre. On imprime au carreau de porcelaine de légers mouvements de va et vient, de manière à bien brasser les hématies au sein du liquide. On note le moment de l'agglutination.

Résultats

a) *Système sérum de Cheval-hématies humaines.* — Nous avons étudié les fractions ED, PD, ES et PS des différents immunsérums de Cheval, ceux-là même qui nous avaient servi pour la localisation de la substance qui flocule la toxine diphtérique. Chacune de ces fractions a été essayée vis-à-vis d'hématies de sujets appartenant à des groupes sanguins différents.

Nous avons constaté que les euglobulines obtenues par précipitation à l'aide du sulfate d'ammonium se comportaient de la même manière que le sérum primitif : même vitesse d'agglutination, même aspect des paquets d'hématies.

Les euglobulines isolées du sérum par dialyse n'agglutinent, au contraire, les hématies que tardivement. Parfois même on n'observe pas d'agglutination.

La fraction peudoglobulinique PD possède un pouvoir agglutinant certain, mais le rassemblement en amas des globules se fait plus lentement qu'avec le sérum entier.

Enfin, la fraction PS semble être dépourvue de pouvoir agglutinant. Mais, très souvent, quand la fraction n'avait pas été soumise à la dialyse, nous avons constaté une lyse assez rapide des érythrocytes, peut-être due à la présence du sel d'ammonium.

(*) Nous remercions nos camarades du Laboratoire de leurs concours, et nous nous excusons auprès d'eux de ces traumatismes minimes mais répétés.

b) *Système sérum de Mouton-hématies humaines.* — Nous avons voulu vérifier si l'on observait également des phénomènes analogues avec les fractions globuliniques d'une espèce différente.

Comme précédemment, nous avons isolé d'un sérum de Mouton (*) les quatre fractions ED, PD, ES et PS. Nous avons examiné leur pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules rouges d'Homme.

Nos résultats ont été exactement les mêmes. Les euglobulines obtenues par la méthode de Porges ont un pouvoir agglutinant bien supérieur à celles obtenues selon Marcus; c'est l'inverse qui se produit pour les deux fractions pseudo-globuliniques.

C. — INTERPRÉTATION DU POUVOIR FLOCULANT DES DIVERSES FRACTIONS GLOBULINIQUES

Nous remarquons la grande différence qui existe, au point de vue du pouvoir floculant, entre les euglobulines obtenues par dialyse et celles précipitées au tiers de saturation en sulfate d'ammonium. Alors que les premières sont complètement dépourvues de précipitines, les secondes, au contraire, contiennent un certain nombre d'unités de floculation.

Il faut rapprocher ces résultats des constatations de Reiner et Torök [785] sur la réagine syphilitique : cet anticorps se retrouve dans les euglobulines précipitées par dialyse, et dans les pseudoglobulines obtenues par la méthode aux sels.

Nos résultats confirment également les constatations premières de Ramon [747] : l'euglobuline, qui ne contient guère d'antitoxine, est proportionnellement beaucoup plus floculante que la pseudoglobuline. Ce même auteur, par la suite, a pu montrer qu'un sérum purifié, qui ne contient

(*) Le sérum de Mouton contient également une hétéro-agglutinine pour les hématies humaines.

plus que la fraction pseudoglobulinique du sérum primitif, ne flocule pas ou flocule très lentement. Il récupère ses propriétés initiales par addition d'euglobuline [773]; Renaux avait fait des constatations tout à fait analogues pour le sérum vieilli [788] (*).

Mœrch, à l'aide du sulfate d'ammonium, a montré que les fractions précipitées les premières ont un rapport $\frac{\text{unités floculantes}}{\text{unités antitoxiques}}$ bien plus grand que les fractions séparées pour des concentrations salines plus importantes [616]. Il faut d'ailleurs noter que cette association entre propriétés antitoxiques et pouvoir floculant s'observe dans le sérum frais de divers animaux [845].

Devant ces faits, on a pu penser que l'antitoxine et la précipitine du sérum antidiphtérique étaient des substances différentes : c'est ainsi que Mœrch [617], injectant à des Lapins des filtrats de culture de bacilles diphtériques non toxigènes, a pu obtenir un anticorps non antitoxique, mais floculant; ce produit, ajouté au sérum antidiphtérique habituel, accélère la précipitation de ce dernier par la toxine, sans avoir aucune influence sur la zone de primofloculation. Récemment encore, Bagdasarian [38] trouve des divergences importantes entre pouvoir antitoxique et pouvoir floculant.

Comment expliquer alors que la précipitation la plus rapide coïncide en fait avec les proportions relatives de toxine et d'antitoxine correspondant à la neutralisation exacte ? Il faut admettre que l'organisme fabrique tous les anticorps avec la même activité, et qu'un parallélisme assez étroit se maintient entre les quantités de ces divers principes que le sérum renferme, de telle façon qu'un sérum riche en précipitines antiprotéiques est riche aussi en antitoxines (Bordet).

Ces arguments, cependant, ne peuvent s'opposer à la

(*) La dialyse ou le chauffage du sérum antidiphtérique augmente les temps de floculation par dénaturation de l'euglobuline [538].

théorie unitaire des anticorps. En effet, si un sérum chauffé à 58° garde son pouvoir antitoxique et perd la majeure partie de son pouvoir floculant, on peut encore, par la technique de l'anneau, mettre en évidence ses propriétés précipitantes vis-à-vis de la toxine (Hoen et Tscherkow [398, 399]).

Nous pouvons, d'autre part, émettre une hypothèse qui rend assez bien compte des différences de propriétés floculantes des euglobulines et des pseudoglobulines.

Dans la formation du sérum antidiphtérique, les globulines normales sont modifiées et acquièrent un caractère spécifique vis-à-vis du poison microbien. Ce sont surtout les pseudoglobulines qui subissent l'empreinte de l'antigène; les euglobulines sont moins aptes à subir cette modification : aussi, ne renferment-elles qu'un petit nombre d'unités antitoxiques (*). Le phénomène initial de la réaction toxine-antitoxine est l'accolement de l'antigène et de l'anticorps, d'où résulte la neutralisation des propriétés toxiques du bouillon. Ensuite, l'adjonction de molécules des deux substances va former un édifice important, en forme de « réseau », qui va s'insolubiliser ou non.

Si le réseau se forme avec uniquement des molécules de pseudoglobulines, dont on connaît le caractère particulièrement hydrophile, le complexe n'aura pas tendance à floculer.

Lorsque des euglobulines se trouvent dans le milieu, ces molécules non hydrosolubles vont s'incorporer à l'édifice et lui conférer un pouvoir précipitant d'autant plus important qu'elles entreront en plus grand nombre dans sa composition. Il suffit d'ailleurs d'une faible quantité d'euglobulines pour obtenir la floculation.

Les euglobulines, faiblement antitoxiques, ne doivent avoir, par molécule, que peu de motifs spécifiques, beau-

(*) Nous nous permettons de rapprocher ces conceptions de celles de Bordet. « Toute une gamme de globulines existe... dans laquelle les divers anticorps occupent chacun une bande assez large. »

coup moins que les pseudoglobulines. Pour neutraliser une même dose de toxine, il faut donc beaucoup plus de molécules d'euglobulines que de molécules de pseudoglobulines. Le complexe formé par les premières sera donc, d'une part, plus volumineux et, d'autre part, plus hydrophobe. Il n'aura donc aucune raison de rester en solution.

Il est bien évident que des globulines provenant d'un sérum de Cheval normal ne possèdent pas de motifs spécifiques et, de ce fait, ne peuvent, en s'incorporant au réseau antigène-anticorps, modifier ses caractères de solubilité.

CONCLUSIONS DU PREMIER CHAPITRE

Dans ce premier chapitre, nous avons étudié le pouvoir précipitant (et accessoirement agglutinant) d'euglobulines et de pseudoglobulines sériques obtenues selon différentes méthodes. Les expériences que nous venons d'exposer nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

1° La localisation des propriétés anticorps, dans les fractions euglobulines ou pseudoglobulines, dépend avant tout de la technique utilisée pour obtenir ces fractions.

Les euglobulines obtenues par dialyse ne possèdent ni le même pouvoir floculant ni le même pouvoir agglutinant que celles isolées du sérum par précipitation à l'aide des sels neutres.

Nous apportons donc une confirmation immunologique aux résultats purement physicochimiques obtenus par Tayeau et Martin [897]. Ces auteurs, étudiant le fractionnement du sérum selon la méthode de Fuld, Porges et Spiro, en avaient conclu que les protéines précipitées au tiers de saturation contenaient la totalité des euglobulines (*) et une très abondante proportion de pseudoglobulines (*) ; la fraction précipitant entre le tiers et la demi-saturation en sulfate d'ammonium est constituée par des pseudoglobulines (*), mais celles-ci ne représentent qu'une faible portion de cette fraction [594].

(*) Selon la définition de Marcus.

Il est donc absolument nécessaire, lorsqu'on parle d'euglobulines ou de pseudoglobulines, de bien spécifier la technique qui a servi à isoler ces fractions.

2° Les euglobulines du sérum antidiphtérique, obtenues par dialyse, sont dépourvues de toute précipitine. Celles isolées au moyen de sels neutres précipitent rapidement la toxine correspondante, mais ne contiennent qu'une faible quantité d'unités floculantes. Les pseudoglobulines, au contraire, floculent beaucoup plus difficilement, mais la précipitation correspond à un titre plus élevé. Pour avoir une floculation comparable à celle que donne le sérum total, il faut à la fois les pseudo- et les euglobulines.

Les euglobulines qui proviennent d'un sérum non immun ne peuvent conférer aux pseudoglobulines d'un sérum antidiphtérique le pouvoir précipitant du sérum initial.

Nous avons émis une hypothèse basée sur la théorie du réseau de Marrack pour expliquer les faits précédents. Cette hypothèse attire l'attention sur l'influence des fonctions hydrophiles ou hydrophobes sur la solubilité ou la précipitation des complexes spécifiques.

Nous savons, d'autre part, que la solubilité des protéines est considérablement modifiée par les lipides qui leur sont unis sous forme de cénapses. Aussi, étudierons-nous maintenant le rôle des lipides dans les réactions de précipitation antigène-anticorps.

CHAPITRE II

ROLE JOUÉ PAR LES LIPIDES DANS LES RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS.

Les antigènes sont, pour la plupart, de nature protéidique; les propriétés anticorps sont supportées par des globulines. Or, la majorité des protéines et celles du sérum tout particulièrement, sont toujours, comme nous allons le voir, étroitement associées à des lipides. Quel est le rôle joué par ces substances dans la réaction de précipitation spécifique ?

Nous rappellerons en premier lieu quelques notions fondamentales sur les graisses du sérum et sur l'état dans lequel elles se trouvent dans ce milieu, puis, après une brève revue des travaux immunologiques consacrés aux lipides, nous exposerons nos recherches personnelles.

I. — GÉNÉRALITÉS

A. — LES LIPIDES DU SÉRUM SANGUIN

On trouve dans le sérum sanguin une quantité assez importante de graisse : 6 à 10 grammes par litre. Ces substances lipidiques sont constituées surtout par des phosphatides, des stérides, des stérols et des glycérides. On sait que ces produits, insolubles dans l'eau, se dissolvent dans les solvants organiques (éther, ligroïne, etc.).

Or, le sérum sanguin est un milieu essentiellement

aqueux : la quantité de lipides hydrophobes qu'il renferme en solution peut donc sembler assez paradoxale, car le sérum se présente comme un liquide homogène et limpide. Bien plus, si l'on épuise un sérum normal avec de l'éther, ce solvant s'avère incapable d'extraire et de dissoudre les lipides sériques [419, 339, 879, 344, 141, 571].

Ainsi donc, les substances lipidiques du sérum sont dans un état particulier qui leur confère des propriétés nouvelles : solubilité dans l'eau et dissimulation à l'égard de leurs solvants habituels. Ce point a suscité de nombreux travaux. Nous ne rappellerons pas ici toutes les théories émises pour expliquer la stabilité des lipides en phase aqueuse (*) [542, 732, 967, 345] : elles sont toutes rapidement tombées en désuétude.

A la suite de l'observation princeps de Miescher [611], on pressentit le rôle des protéides dans la solubilisation des lipides [63] : on ne peut mettre en évidence et isoler les substances lipidiques qu'après coagulation des protéines par l'alcool [475]. Cependant, le rôle des protéines était loin d'être admis par tous [338, 325].

Machebœuf, en 1928 [553], apporte le point final à la discussion en isolant, à partir des albumines sériques, des complexes lipidoprotéidiques de composition constante auxquels il donna le nom de « cénapses acidoprécipitables » (**).

Comment se fait l'union entre protéides et lipides ? Plusieurs auteurs [520, 202, 241, 928], à la suite de Hoppe-Seyler [419], pensent qu'il s'agit d'une véritable combinaison chimique. Pour certains, il y aurait même une liaison ionique [972]. Machebœuf et Sandor [565] émettent au contraire l'hypothèse que l'union entre les deux constituants se ferait par attraction réciproque des groupements analo-

(*) Voir à ce sujet la monographie de Machebœuf [555] et la thèse de Tayeau [895]. Voir aussi [135].

(**) Voir l'état actuel de la question dans une revue générale, récente, de cet auteur [559].

gues, dus aux forces de Van der Waals. Il y aurait en particulier solvatation des chaînes polyméthyléniques des acides gras des lipides et des restes d'aminoacides aliphatiques des chaînes peptidiques.

Cette conception a été élégamment confirmée par Macheboeuf et Tayeau [566] : un savon alcalin, qui contient lui aussi une longue chaîne polyméthylénique, se montre susceptible, en présence d'éther, de détruire les cénapses lipidoprotéidiques et de rendre les lipides extractibles par ce solvant, tout en formant de nouvelles cénapses protéines-savons. Nous verrons d'ailleurs plus loin qu'il existe certainement d'autres types de liaison.

B. — IMPORTANCE DES LIPIDES EN IMMUNOLOGIE

Les rapports étroits entre les protéides et les substances lipidiques ont attiré très tôt l'attention des chercheurs sur les propriétés immunologiques des graisses.

Pendant longtemps, on a cru que les lipides étaient doués d'un pouvoir antigénique propre (*). De nombreux auteurs [812, 669], en injectant différents extraits alcoolo-éthérés, purent mettre en évidence la formation d'anticorps. Mais ces préparations contenaient toujours de faibles traces de protéines qui pouvaient très bien rendre compte de l'activité antigénique [959, 580]. Les anticorps suscités par injection de lipides sont d'ailleurs inconstants [512] ; quelques auteurs n'ont même jamais pu les mettre en évidence [719, 460].

Si le pouvoir antigénique des différents lipides, phosphatides, stérols, etc., semble aujourd'hui contesté, tout le monde s'accorde, au contraire, à considérer ces substances comme des haptènes. L'immunisation réalisée au moyen d'un mélange de lipides et de protéides est susceptible d'induire une réponse spécifique vis-à-vis des graisses injec-

(*) Voir à ce sujet [191, 177].

tées (*). D'autre part, comme nous l'avons déjà signalé (voir p. 26), on a pu isoler des organismes plusieurs haptènes de constitution lipidique. Ces haptènes lipidiques jouent un rôle capital dans le phénomène d'hémoagglutination [974, 976, 977, 209].

De nombreuses réactions de diagnostic de la syphilis (**) s'effectuent également avec des haptènes de nature lipidique, et l'on sait que plusieurs antigènes alcooliques utilisés dans la pratique sérologique courante sont artificiellement additionnés de cholestérol (***). Le pouvoir antihémolytique de ce stérol est bien connu. D'autre part, les travaux de Délezenne et Fourneau [175] ont montré le rôle important de certains phosphatides dans l'hémolyse par les venins de Cobra; les lipides sont donc étroitement liés aux phénomènes d'hémolyse biologique (****). Ils interviennent aussi dans la neutralisation des toxines [501].

La formation d'anticorps par l'organisme modifie le métabolisme des graisses : on a observé depuis longtemps des variations de la lipémie chez les animaux soumis à l'immunisation. Dès 1908, Takaki [885] obtenait des extraits alcoolo-chloroformiques plus riches avec les immunsérums qu'avec des sérums normaux. Plus tard, Danysz [162], puis Ionesco [434] mettaient en évidence une augmentation du cholestérol sanguin chez les animaux traités par divers antigènes. Ces faits ont d'ailleurs été contestés [446]. Marie [586] ne trouve pas de modifications de la cholestérolémie chez les Chevaux producteurs de sérum antidiphtérique ou tétanique, cependant fortement immunisés; il y a, au contraire, un accroissement important du cholestérol

---

(*) C'est le phénomène de l'« immunisation combinée » découvert par Landsteiner et Simms [497].

(**) Réactions de Sachs-Georgi, de Sachs-Witebsky, de Vernes au péréthynol, de Meinicke et de Kahn.

(***) Réactions de Sachs, de Kahn, de Müller, de Hinton, de Eagle et de Kline. Pour plus de détails sur les réactions sérologiques de la syphilis, consulter [178].

(****) Voir le rapport de Belfanti [51].

sérique chez les animaux qui ne produisent pas une antitoxine de titre élevé.

L'influence des substances lipidiques sur la réaction de précipitation antigène-anticorps a été étudiée essentiellement aux deux points de vue suivants :

— Analyse du contenu lipidique des floculats spécifiques;

— Propriétés précipitantes des sérums délipidés.

Nous allons examiner maintenant ces travaux.

C. — LES LIPIDES DANS LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE

L'extraction complète des lipides sériques nécessite, dans un premier temps, la scission des cénapses lipidoprotéidiques : on l'obtient en traitant le sérum par l'alcool bouillant, par exemple [475]. Un procédé aussi brutal est inapplicable en immunochimie, où les substances étudiées sont très fragiles.

En 1910, W. B. Hardy et Mme S. Gardiner mirent au point une technique capitale, permettant la délipidation quasi totale du sérum sans dénaturer son contenu protéidique [340] : elle consiste à traiter le sérum par l'alcool absolu à une température inférieure à — 10° C., puis à extraire le coagulum ainsi obtenu par l'éther, à froid d'abord (*) puis à la température ordinaire. La poudre blanche ainsi obtenue, parfaitement soluble dans l'eau, donne une solution qui a l'apparence et la limpidité du sérum initial (**). Cette méthode a rendu des services considérables à la protidologie et a été très souvent employée par la suite. Young [988], puis Hewitt [393] lui ont apporté quelques modifi-

(*) Pour chasser l'alcool du coagulum.

(**) Les techniques modernes, l'ultracentrifugation en particulier, ont permis à Mc Farlane [549-551] de montrer que le sérum ainsi reconstitué n'avait pas toutes les caractéristiques physiques du sérum primitif (degré de dispersion des protéines). Ces modifications, en dehors de tout enlèvement des lipides, peuvent s'expliquer par la simple action de l'alcool.

cations minimes. Hardy et Gardiner, pressentant déjà tout l'intérêt immunologique de leur méthode, avaient eux-mêmes délipidé du sérum antidiphtérique et constaté que son pouvoir antitoxique n'avait pas subi de modifications. Ils ne pouvaient évidemment pas étudier les propriétés floculantes de l'immunsérum qui n'étaient pas encore connues. Appliquant un peu plus tard cette même technique, Dean [164] montra que la délipidation ne détruit pas le chaînon moyen du complément.

En 1924, Flössner et Kutscher [264] montraient la présence, dans certains précipités spécifiques, de 18 p. 100 de substances organiques solubles dans l'alcool et dans l'éther; les deux tiers de l'extrait alcoolo-éthéré étaient solubles dans le chloroforme. Douglas et Dudley [204], avec des systèmes précipitants sérum-antisérum correspondant, obtinrent des floculats dont un quart, extractible par l'éther, consistait surtout en cholestérol.

Hartley, en 1925 [342], entreprit toute une série de travaux pour élucider le rôle des substances lipoïdiques des antisérums. Par délipidation selon une technique inspirée de celle de Hardy et Gardiner, il obtint des solutions qui conservaient les propriétés agglutinantes (*) et hémolysantes des sérums originels. Les sérums d'individus syphilitiques, à sérologie positive, devenaient négatifs après l'élimination des lipides. Hartley étudia la réaction de précipitation spécifique avec le système sérum de Cheval-antisérum de Lapin. Il mit en évidence le rétrécissement de la zone de floculation après délipidation de l'antigène ou de l'anticorps, puis la disparition de cette floculation après délipidation des deux « reagents ». Seul le deuxième temps de la floculation est inhibé, car l'union de l'anticorps à l'antigène se traduit par une légère opalescence. De même, un sérum antidiphtérique privé de ses lipides ne flocule

(*) Merril et Fleisher [603] ont confirmé ce fait; les agglutinines, dont nous avons vu l'analogie avec les précipitines, ne sont pas modifiées par soustraction des lipides du sérum où elles se trouvent.

plus la toxine correspondante, mais conserve intactes ses propriétés neutralisantes.

Ces résultats concernant le sérum antidiphtérique de Cheval furent confirmés quelques années plus tard par Linderström-Lang et Schmidt [522]. Ces auteurs montrèrent en outre que l'immunsérum délipidé, toujours antitoxique, non seulement ne flocule plus la toxine, mais encore inhibe la floculation d'un sérum antidiphtérique normal auquel il est mélangé, même en faibles proportions (une partie de sérum délipidé pour neuf parties de sérum normal). Les substances extraites par l'éther n'ont aucun pouvoir précipitant. Pour ces immunologistes, la disparition du pouvoir précipitant et la disparition du pouvoir antitoxique seraient en faveur de l'existence, dans le sérum, de deux substances différentes, une antitoxique, l'autre floculante. Cependant, le complexe toxine diphtérique-antitoxine de Cheval, obtenu dans les conditions habituelles, renferme peu de lipides : Marrack et Smith [590] ne purent en extraire plus de 1 p. 100. Bien plus, les mêmes auteurs, dans le précipité pseudoglobuline de Cheval-antisérum de Lapin [591], ne trouvèrent même pas de lipides (pas de cholestérol en particulier), contrairement aux résultats de Douglas et Dudley. La même année, employant un système précipitant différent (hémoglobine-antihémoglobine), Breinl et Haurowitz [99] extraient 2 à 8 p. 100 de lipides des floculats.

Plusieurs travaux ont été consacrés aux sérums précipitant les polyosides bactériens. Felton et Kauffmann signalent que le sérum des Chevaux immunisés avec des pneumocoques des types I et II contiennent en moyenne 27 p. 100 de lipides de plus que les sérums provenant de Chevaux normaux [257]. Chow et Gœbel [147] trouvent encore 25 p. 100 de lipides dans une globuline anticorps spécialement purifiée, dont les neuf dixièmes sont spécifiquement précipitables. Horsfall et Goodner, en 1935 [423], entreprennent une importante étude sur le rôle des lipides dans la précipitation comparée des sérums antipneumococciques

de Cheval et de Lapin par le polyholoside spécifique correspondant. Ils confirment, pour ce point particulier, les différences assez importantes de comportement existant entre les sérums des deux espèces [832, 994, 35, 244, 315]. L'immunsérum de Cheval, délipidé, perd ses propriétés agglutinantes et floculantes. L'addition secondaire d'une suspension de l'extrait alcoolo-éthéré, ou de cholestérol, ne redonne pas au sérum ses propriétés primitives : on peut cependant arriver à restaurer les pouvoirs précipitant et agglutinant en ajoutant une lécithine au sérum traité (*). La présence de cholestérol empêche cette restauration (**). Avec le sérum de Lapin privé de ses lipides, on n'observe qu'une simple réduction des pouvoirs de floculation et d'agglutination; l'addition de céphaline (et non de lécithine) redonne au sérum son comportement habituel (***). Ici encore, si la disparition des lipides empêche la formation du précipité spécifique, l'union de l'antigène et de l'anticorps a cependant lieu, s'accompagnant même, avec le sérum de Cheval, de la fixation du complément [424]. Dans les deux systèmes envisagés, la teneur des précipités en substances lipoïdiques est assez variable, allant de 4 à 51 p. 100; la quantité totale de lipides dans les flocons est indépendante de leur teneur en protéine, mais est en rapport avec la richesse de l'immunsérum en lipides [425].

Trensz [926] a observé chez les paludéens que leur sérum, délipidé par la méthode de Piettre et Vila [716], ne donne plus la réaction à la mélanine soluble (****).

(*) Schulman et Rideal ont étudié la possibilité d'existence de tels complexes protéines-lécithines [849].

(**) Cette action inhibitrice du cholestérol est comparable à ses propriétés empêchantes vis-à-vis de l'hémolyse par le saponoside [849].

(***) La restauration du pouvoir précipitant de l'immunsérum, par la lécithine chez le Cheval et par la céphaline chez le Lapin, peut sembler assez paradoxale, car l'analyse des lipides des précipités spécifiques obtenus avec les sérums non traités montre la présence de céphaline chez le Cheval et de lécithine chez le Lapin [426]. Signalons encore que l'addition à un sérum antipneumococcique normal de Cheval, de petites quantités de cholestérol et de lécithine, diminue son pouvoir protecteur chez la Souris; on n'observe rien de tel chez le Lapin [316].

(****) Méthode de séro-diagnostic du paludisme, décrite par Trensz et dérivée de la mélanofloculation de Henry [391].

Tulasne [929], utilisant la technique de délipidation aux savons de Machebœuf et Tayeau [566], trouve que les taux de précipitation s'avèrent identiques avec des globulines naturelles ou délipidées; il en conclut que les lipides liés aux globulines n'ont aucune influence sur la fonction anticorps. L'auteur ne signale pas le système immunologique avec lequel il a obtenu ce résultat qui est en opposition avec les précédents.

Cependant, utilisant cette même technique, Polonovski, Faure et Machebœuf [724], s'ils ne peuvent empêcher complètement la floculation, l'observent toutefois dans une zone beaucoup plus étroite qu'avec le sérum normal. Enfin, Delage a récemment consacré une longue étude [174] au rôle des lipides dans certaines activités biologiques des sérums. Les antitoxines, les hémolysines et les agglutinines observées par cet auteur ont exactement la même activité après enlèvement complet des lipides. Un sérum syphilitique, au contraire, délipidé aussi bien par la méthode de Hardy et Gardiner que par celle de Machebœuf et Sandor [565] (*), ne donne plus, après cette opération, de réactions positives d'hémolyse (Calmette-Massol) ou de floculation (Kahn, Meinicke). Les précipitines antipyocyaniques, antifluorescens et anti-Whitmore perdent complètement, après délipidation, leur pouvoir initial de floculer les endotoxines de ces bactéries Gram négatif, préparées par la méthode de précipitation trichloracétique de Boivin et Mesrobeanu [78].

Les différents travaux que nous venons de passer en revue ont bien mis en évidence le rôle joué par les lipides dans la formation du floculat spécifique. Il semble établi que les précipitines sériques sont de véritables cénapses lipido-protéidiques (**). Cependant, de nombreux points demeurent encore obscurs dans ce domaine : quel est le rôle

(*) Traitement du sérum par l'éther légèrement alcoolisé.

(**) Notons d'ailleurs que les animaux soumis à un régime riche en certaines fractions lipoïdiques (cholestérol) produisent des anticorps en plus grande quantité [140].

respectif des différentes fractions lipidiques ? La délipidation de l'antigène (*) amène-t-elle les mêmes résultats que celle de l'anticorps ? De nouvelles techniques de délipidation, partielle [889] ou totale [175], ont été récemment décrites : quelle peut être leur répercussion immunologique ?

C'est pour répondre à ces différentes questions que nous avons entrepris les expériences qui sont exposées dans les pages suivantes.

II. — TRAVAUX PERSONNELS

Nos essais ont porté sur deux points différents :

— Grâce à la technique de « décholestération » élective, décrite par Tayeau [889, 890, 892], nous avons cherché à préciser le rôle du cholestérol et des stérides dans la formation du précipité spécifique. Nous avons utilisé les deux systèmes toxine diphtérique-antitoxine de Cheval et sérum de Cheval-antisérum de Lapin.

— Nous avons été amené à pratiquer des délipidations totales. La technique de Hardy et Gardiner étant de réalisation difficile lorsqu'on ne dispose pas d'une chambre froide, nous avons étudié la valeur de deux autres méthodes de délipidation plus commodes à réaliser : celle de Piettre et celle de Delsal. Nous avons comparé les résultats obtenus avec les sérums traités par les différentes méthodes.

A. — ROLE DU CHOLESTÉROL DANS LES RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE

Le cholestérol forme une part assez importante des lipides sériques puisque, chez l'Homme, par exemple, on en trouve environ 1,5 g. par litre, un tiers existant sous forme d'alcool libre, les deux autres tiers estérifiant des acides gras pour former des stérides.

Ce stérol, comme les autres substances lipoïdiques, est

(*) Quand celui-ci est de nature lipidoprotéidique.

insoluble dans l'eau. Il se trouve cependant maintenu en solution dans le sérum grâce à ses attaches avec les protéines (cénapses cholestéroprotéidiques). Machebœuf et Tayeau [566], étudiant l'action des savons en présence d'éther sur le sérum sanguin, avaient pu, grâce à ces produits, libérer de ses liaisons et extraire une grande partie du cholestérol sérique. On peut concevoir que les stérols libérés par les savons se trouvaient liés aux protéides par solvatation de leur chaîne aliphatique sur les chaînes homologues des protéines, ou bien qu'ils sont estérifiés par des acides gras solvatés eux-mêmes sur des protéides (Tayeau). Il faut donc admettre que les stérols que l'éther ne peut extraire en présence de savons sont unis aux protéides par un autre type de liaison. Tayeau [889] a émis l'hypothèse d'une union par solvatation réciproque des noyaux cycliques du cholestérol sur des parties de forme semblable existant dans les molécules protéidiques (*).

S'il en était ainsi, des substances hydrosolubles, possédant dans leur molécule des cycles cyclopentanophénanthréniques voisins de ceux de stérols, devraient pouvoir prendre la place de ces alcools et les expulser des cénapses lipidoprotéidiques (icélomorphisme). Certains saponosides (**), ceux dont l'aglycone (sapogénol) est du type cyclopentanophénanthrénique (voir fig. 20), répondent à ces conditions.

Si l'on ajoute à dix volumes de sérum un volume d'une solution à 10 p. 100 d'un tel saponoside et qu'on agite le mélange avec de l'éther, on s'aperçoit qu'il apparaît bientôt dans la phase sérique un louche qui va en s'intensifiant.

(*) Cette hypothèse a été émise en 1941, époque à laquelle la théorie des cycles de Wrinch [983] était généralement admise en France. Pour Wrinch, la structure secondaire des protéines globulaires provient de flexions de la chaîne peptidique et de la formation d'éléments polycycliques de forme voisine des cycles présents dans la molécule des stérols. L'existence de ces cycles, déjà entrevue par Abderhalden [10-12], Sadikow [813], Karrer [451], Bergmann [56] et Troensegaard [927], a été récemment confirmée par Abribat [15] qui retrouve les bandes caractéristiques du cyclopentanophénanthrène dans le spectre d'absorption ultra-violette de la gélatine.

(**) Pour plus de détails sur les saponosides, consulter [810, 945, 96].

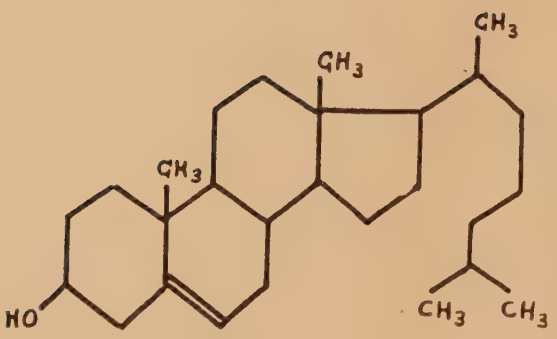


Fig. 20.

Cholestérol.

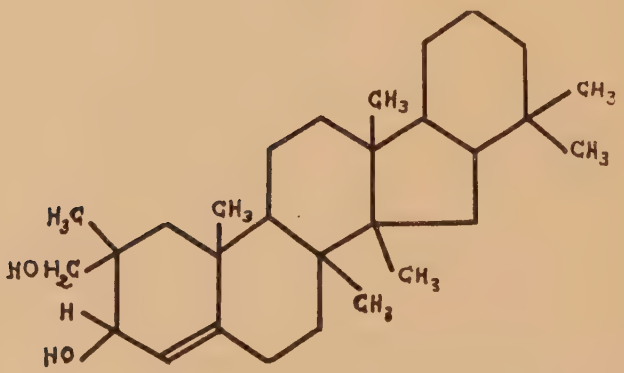


Fig. 20 *bis*.

Sapogénol.

Ce fin précipité se dissout bientôt dans l'éther qui se teinte légèrement en jaune, tandis que la phase sérique reprend son aspect limpide. La couche éthérée, séparée puis évaporée, laisse un résidu qui contient la totalité du cholestérol sérique mais qui ne renferme aucune trace de phosphore : la présence des saponosides n'a donc pas permis l'extraction des phosphatides. Les cénapses phosphatidoprotéidiques n'ont pas été décomposées, car si l'on sépare dans la phase sérique les globulines et les albumines à l'aide du sulfate d'ammonium, on retrouve sur ces fractions, ainsi précipitées la totalité du phosphore lipidique.

Nous avons donc ainsi un procédé nous permettant de décomposer électivement les cénapses cholestéroprotéidiques et d'extraire la totalité du cholestérol sérique sans toucher aux phosphatides qui conservent leurs liaisons avec les protéines. Notons dès maintenant que ce résultat ne peut être obtenu avec tous les saponosides, mais uniquement avec ceux dont l'aglycone est du type cyclopentanophénanthrénique. Les saponosides dont l'aglycone appartient à la série terpénique sont sans action sur le cholestérol sanguin (*).

On peut se demander si la libération du cholestérol peut être effectuée par d'autres substances hydrosolubles de constitution voisine de celle des saponosides. Tayeau [900] a essayé les sels biliaires, cholate (fig. 21) et taurocholate de sodium.

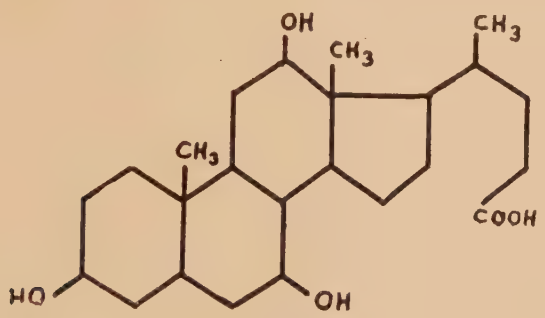


Fig. 21.

Acide cholique.

Ces produits sont capables, le premier surtout, de détruire les cénapses cholestéroprotéidiques sans toucher aux cénapses phosphatidoprotéidiques, mais l'éther est incapable d'extraire le cholestérol qui, bien que libéré de ses attaches protéidiques, reste dans la phase aqueuse sous forme de complexe hydrosoluble cholestérol-sel biliaire (**).

(*) On pourrait penser que les saponosides n'agissent que grâce à leurs propriétés tensio-actives. S'il en était ainsi, tous les saponosides (stéroliques et terpéniques) devraient rompre les cénapses cholestéroprotéidiques : il n'en est rien [896].

(**) Les complexes lipides-sels biliaires ont été souvent étudiés [944, 936, 937, 134]. On peut aussi détacher le cholestérol dans le sérum par

Pour priver le sérum de son cholestérol, nous avons employé la méthode aux saponosides, que nous avons appliquée au sérum antidiphtérique de Cheval (système toxine diphtérique-antisérum de Cheval) ainsi qu'aux deux constituants du système sérum de Cheval-antisérum de Lapin. Avant de relater nos expériences, nous exposerons rapidement ces techniques.

1° Techniques utilisées

a) *Obtention des sérums*

α. Sérum antidiphtérique et sérum normal de Cheval. — Nous avons toujours opéré sur des sérums frais, qui nous ont été fournis sous forme de sang total. La stabilité du système lipidoprotéidique sérique s'accroît en effet considérablement par le vieillissement [173, 888], et Tayeau a montré que l'extraction du cholestérol par l'éther en présence de saponosides n'est pas totale sur un sérum vieilli et conservé en glacière [894].

β. Sérum de Lapin anti-Cheval (*). — Plusieurs Lapins ont été préparés par injections répétées de sérum de Cheval dans la veine marginale de l'oreille ou dans le péritoine. Le plus souvent, ces injections, de 2 à 5 cm³, ont été faites trois fois par semaine et poursuivies pendant au moins un mois. A partir de la deuxième semaine, pour éviter les accidents anaphylactiques, l'injection était précédée d'une injection désensibilisatrice d'une ou deux gouttes d'antigène par voie sous-cutanée. Le sang était prélevé par voie intracardiaque, selon une technique décrite par Nicolle [654]. Nous avons fait usage d'une seringue, rincée au préalable avec une solution très diluée d'héparine dans l'eau physiologique. Le sang recueilli (30 à 40 cm³) est immédiatement centrifugé, puis le plasma décanté. Le plus souvent, l'anticoagulant ayant été employé à très faible dose, on observe une coagulation plasmatique, et une nouvelle centrifugation nous fournit le sérum (**).

---

action du dihydro-abiétate de sodium [564], dont la formule présente aussi quelque analogie avec celle du cholestérol. Mais l'extraction par l'éther n'est pas complète.

(*) Nous remercions M. R. Pautrizel, Chef de Travaux et chargé de cours à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux, qui nous a fourni ces sérums, et qui a effectué avec nous diverses expériences sur ces produits.

(**) L'emploi de traces d'héparine a eu l'avantage d'éviter la coagulation du sang dans la seringue,

b) *Décholestération des sérums*

Nous avons suivi rigoureusement la technique employée par Tayeau en vue d'une extraction quantitative [890]. Dans une ampoule à décanter, nous introduisons un volume connu de sérum (par exemple, 10 cm³) et un volume dix fois moindre d'une solution neutre de saponoside (*) à 10 p. 100. On mélange, puis on ajoute 20 cm³ d'éther; on agite alors vivement; malgré l'agitation, les deux phases se séparent très vite d'une manière parfaite. On laisse reposer un instant. Comme nous l'avons déjà signalé, on constate que la phase sérique se trouble et que le cholestérol libéré se rassemble à l'interface de deux liquides; on agite à nouveau; la phase aqueuse s'éclaircit; on soutire alors cette couche sérique, tandis que l'éther est transvasé par le goulot de l'ampoule dans une fiole de Fourneau. On procède ensuite à trois nouveaux épuisements analogues du sérum par 20 cm³ d'éther, les fractions étant toujours recueillies dans la fiole de Fourneau. Après ce traitement, la phase sérique est complètement débarrassée du cholestérol. Nous la portons ensuite, pendant trente minutes, au bain-marie à 37° C : dans ces conditions, la majeure partie de l'éther dissous par le sérum s'échappe. Le reste est extrait par l'action du vide. On arrive ainsi à avoir un liquide qui ne présente plus l'odeur d'éther. Souvent, ce liquide est légèrement louche; on l'éclaircit par une centrifugation de dix minutes, à 6.000 tours. Notons que le sérum ainsi obtenu est légèrement dilué par rapport au sérum initial (addition de la solution de saponoside).

c) *Dosage du cholestérol extrait*

La phase éthérée contient, en solution, la totalité du cholestérol et des stérides (**). On évapore l'éther avec précautions sur une platine chauffante; le résidu d'évaporation est laissé, dix minutes environ, dans l'étuve à 105° C. pour éliminer les dernières traces d'eau. C'est sur ce résidu que nous pratiquons la réaction de Liebermann-Burchard (***). La teinte verte s'obtient, en effet, aussi bien avec le cholestérol qu'avec les stérides [815, 330, 561]. D'autre part, la présence de saponosides ne modifie en rien la réaction [890]. Le résidu, après refroidissement, est donc repris par 5 cm³ de chloroforme; on lui ajoute 5 cm³ d'anhydride acétique, puis III gouttes d'acide sulfurique pur. On prépare en même temps un témoin contenant 0,9 cm³ d'une solution chloroformique de cholestérol à 0,5 p. 100, 4,1 cm³ de chloroforme, 5 cm³ d'anhydride acétique et

(*) Saponoside Billault.

(**) Les saponosides n'ont pas la propriété de décomposer les stérides [890].

(***) Consulter [519] et [111].

III gouttes d'acide sulfurique. Après mélange et une demi-heure de repos à l'obscurité, on compare les colorations à l'électrophotomètre de MEUNIER.

d) *Dosage des lipides encore contenus dans le sérum décholestérolé*

Nous avons utilisé la technique de KUMAGAWA très simplifiée. On mesure avec précision une fraction du sérum traité par le saponoside en présence d'éther, qu'on introduit dans un tube à centrifuger conique. On ajoute un excès d'alcool à 95°, qui précipite les protéines, et l'on porte le tube au bain-marie bouillant jusqu'à ébullition de l'alcool, que l'on maintient quelques minutes, tout en brassant le coagulum protéidique avec un fin agitateur. On laisse refroidir, on centrifuge, on recueille l'alcool dans une fiole de FOURNEAU. Cette opération est suivie de nouvelles extractions pratiquées de la même manière, d'abord à l'alcool bouillant (deux fois), puis à l'éther (deux fois). L'extrait éthéro-alcoolique contenu dans la fiole de FOURNEAU est évaporé au bain-marie, puis déshydraté par le vide sulfurique. Le résidu obtenu est traité par le chloroforme, qui va dissoudre électivement et totalement les substances lipidiques. Cette solution chloroformique est divisée en deux portions. Sur la première, on pratique la réaction de LIEBERMANN pour bien vérifier l'absence de cholestérol; sur la seconde, on dose le phosphore total (phosphore lipidique) selon la technique suivante, proposée par MACHEBŒUF [553] et que nous empruntons à TAYEAU [895].

e) *Dosage du phosphore lipidique*

Le principe de cette méthode est de minéraliser le phosphore lipidique; l'acide phosphorique formé est transformé en phosphomolybdate d'ammonium; l'addition d'un excès de soude transforme à chaud ce dernier en phosphomolybdate de sodium en chassant l'ammoniac; le dosage de l'excès de soude permet d'apprécier l'alcali qui s'est fixé sur le phosphomolybdate et, par déduction, le phosphore de la prise d'essai.

Pratiquement, la technique comprend deux opérations : la destruction et le dosage.

Destruction. — Une partie de l'extrait lipidique, contenant une quantité de phosphore comprise entre 0,056 milligrammes et 0,56 milligrammes, est placée dans un matras de KJELDAHL avec 1 cm^3 d'acide sulfurique et 2 cm^3 d'acide nitrique pur. On porte à l'ébullition. Si la solution reste encore fortement colorée après disparition des vapeurs nitreuses, on ajoute de nouveau 0,5 cm^3 d'acide nitrique et l'on continue la destruction jusqu'à l'obtention d'un liquide parfaitement incolore et la disparition des vapeurs nitreuses,

Dosage. — Après refroidissement, on ajoute 6 cm³ d'eau et 2 cm³ de solution saturée de nitrate d'ammonium, puis on porte au bain-marie bouillant pendant une quinzaine de minutes. On ajoute à ce moment 6 cm³ d'une solution de molybdate d'ammonium à 5 p. 100 et on laisse encore dix minutes au bain-marie. Après refroidissement, on ajoute 5 cm³ d'alcool; il s'est formé un précipité jaune de phosphomolybdate d'ammonium que l'on recueille sur un filtre en verre d'Iéna, monté sur une fiole à vide. Le précipité est soigneusement lavé avec de l'alcool à 50° jusqu'à ce que le liquide de lavage ne rougisse plus un papier bleu de tournesol. La fiole à vide est alors bien rincée. Le précipité de phosphomolybdate d'ammonium est dissous dans 2 cm³ d'ammoniaque au quart, le filtre est bien rincé et la solution obtenue est placée dans un grand matras de Kjeldahl avec II gouttes de phtaléine du phénol (en solution alcoolique) et 10 cm³ de soude N/20. Le nombre de centimètres cubes de soude utilisés multiplié par 0,056 indique le poids de phosphore (en milligrammes) contenu dans la prise d'essai.

Nous avons toujours vérifié que l'éther, agissant sur le sérum en présence de saponosides, n'extrayait pas de phosphatides.

f) *Réaction de précipitation spécifique*

α. Toxine diphtérique-sérum antitoxique de Cheval, voir p. 139.

β. Sérum de Cheval-antisérum de Lapin. — Le titrage de l'activité précipitante de l'immunsérum a été effectué selon la technique de Dean et Webb [170], par estimation de l'optimum de floculation en présence de quantités constantes d'anticorps et d'un égal volume d'une dilution croissante d'antigène (« α procedure »).

Dans une série de tubes à hémolyse de même calibre, on introduit un même volume d'immunsérum de Lapin (le plus souvent 1 cm³ d'une dilution au 1/4 ou au 1/8), puis un égal volume d'antigène; dans le premier tube, on emploie l'antigène pur; dans le second, une dilution au demi; dans le troisième, une dilution au quart, etc. Chaque tube est agité par deux retournements successifs; on note le temps; les tubes sont laissés à la température ambiante si l'immunsérum est suffisamment avide. Si, au contraire, le sérum précipitant est peu actif, on pratique la réaction à 37° C., pour que les temps de floculation ne soient pas trop longs. Ici encore, on note la primofloculation, c'est-à-dire l'apparition de flocons directement visibles à l'œil nu.

2° Expériences préliminaires

La méthode de décholestération de Tayeau met en œuvre deux réactifs : le saponoside et l'éther. Nous nous sommes

demandé quelle pouvait être l'influence de ces produits sur les précipitations spécifiques.

a) *Action de l'éther*

Dans nos expériences, nous avons toujours cherché à éliminer l'éther, comme nous l'avons signalé, par action de la chaleur modérée et par le vide. Malgré ces précautions, il est difficile d'éliminer entièrement le solvant, qui reste fortement adsorbé sur les protéines [270] (*). Ces traces d'éther sont susceptibles de perturber fortement les réactions sérologiques [270, 326]. Stuber a montré que les agglutinines voyaient leur activité diminuer en présence d'éther [877]. Si ces résultats ont été discutés [474], il faut nous rappeler que les réactions d'hémolyse spécifique sont fortement influencées par l'éther [674, 174]. Quelle est alors l'action de l'éther sur les précipitines spécifiques ?

Pour répondre à cette question, nous avons mis en contact du sérum antidiphtérique et le même volume d'éther dans une ampoule à décanter. Après agitation et contact d'une heure, nous avons recueilli la phase sérique que nous avons séparée en deux portions; l'une de ces fractions a été soumise à la température du bain-marie (37° C.) et à l'action du vide, pour éliminer le solvant. Nous avons étudié comparativement le pouvoir floculant, en présence de toxine ou d'anatoxine, des trois solutions suivantes :

— sérum pur;
— sérum saturé d'éther;
— sérum ayant subi un contact prolongé avec l'éther et débarrassé de la majeure partie de ce solvant.

Ces trois sérums se comportent exactement de la même manière, quant à la primofloculation, à la vitesse de floculation, à l'importance et à la largeur de la zone de précipitation. L'éther ne modifie donc en rien les anticorps floculants.

(*) Seelich a étudié l'affinité de différents sérums pour l'éther [854].

b) *Action du saponoside*

Le saponoside exerce une action importante sur les protéines sériques. On peut se demander si les anticorps ne sont pas dénaturés en sa présence. Il y a quelques années déjà, JARISCH [441, 442], faisant agir un saponoside sur le sérum sanguin, observait un précipité qu'il pensait être constitué de protéides. En réalité, ce précipité n'est autre que du cholestérol qui, libéré de ses liaisons cénapsiques, est insoluble dans l'eau et trouble le sérum; le précipité est soluble dans l'éther qui rend ainsi au sérum presque toute sa limpidité initiale. Cependant, TAKENOMATA a signalé que la saponine empêche les réactions de précipitation spécifique, alors qu'elle ne gêne en rien les réactions d'agglutination [886]. Dans la technique que nous employons, le saponoside reste dans la phase sérique sous forme de complexe protéine-saponoside.

Nous avons voulu savoir si un sérum antidiphtérique contenant 1 p. 100 de saponoside (*) subissait quelques modifications dans son pouvoir floculant. Nous avons pu constater à de nombreuses reprises que cet hétéroside, tout comme précédemment l'éther, n'amène aucune perturbation dans la floculation (**). Nous pouvons donc employer la méthode de TAYEAU pour extraire le cholestérol des immunsérums.

3° SYSTÈME TOXINE DIPHTÉRIQUE-IMMUNSÉRUM DE CHEVAL

Nous avons décholestérolé plusieurs échantillons de sérum antidiphtérique provenant de six Chevaux différents [898]. Nous avons, dans chaque cas, dosé le cholestérol extrait par l'éther et vérifié que ce solvant n'avait pas extrait de phosphatides. Nous avons, en outre, contrôlé

(*) Condition optimum pour l'extraction du cholestérol.

(**) Les auteurs précédemment cités n'ont pas toujours indiqué l'origine et la valeur des saponines employées. Cette notion est cependant essentielle (voir p. 171, première note).

l'absence de cholestérol dans la phase sérique, dont les cénapses phosphatidoprotéidiques n'avaient pas été touchées. Puis nous avons étudié comparativement ce sérum décholestérolé et le sérum initial auquel nous avons ajouté le dixième de son volume d'eau physiologique.

Le pouvoir floculant, dans les deux cas, est absolument analogue : la primofloculation se produit pour la même quantité de sérum et après le même temps de contact. L'aspect macroscopique du précipité est aussi le même. Lorsqu'on examine, après quelques heures de séjour au bain-marie, les deux gammes, on se rend compte que la floculation s'est effectuée sur la même étendue (*). Nous rapporterons uniquement ici le résultat d'une expérience.

Expérience

Sérum 96 (25-1-1946)

Par litre :	Cholestérol total	0,90 g.
	Cholestérol extrait	0,88 g.
	Phosphore lipidique extrait	0
	Cholestérol restant dans la phase sérique (KUMAGAWA)	0
	Phosphore lipidique de la phase sérique	4,8 mg.

(*) Les résultats sont les mêmes, que l'on pratique la floculation de l'immunsérum avec de la toxine ou de l'anatoxine. Notons encore que les différents sérums de Cheval que nous avons utilisés avaient une teneur assez variable en cholestérol, mais que, dans tous les cas, l'extraction a été complète et les résultats sérologiques identiques.

A, Sérum : 15 cm³ + Eau physiologique : 2 cm³.
B, A saturé d'éther.
C, Sérum : 15 cm³ + Solution saponoside à 10 p. 100 : 2 cm³.
D, C extrait par l'éther.

O, Pas de trouble.
L, Louche.
F, Précipité.
F, Primofloculation.

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Toxine, cm³....	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sérum, cm³....	0,05	0,07	0,09	0,12	0,14	0,16	0,18	0,22	0,30	0,45	0,70	1
A	O	O	L	L	L	F	**F**	F	L	L	L	O
B	O	O	L	L	L	F	**F**	F	L	L	L	O
C	O	O	L	L	L	F	**F**	F	L	L	L	O
D	O	O	L	L	L	F	**F**	F	L	L	L	O

La primofloculation s'effectue dans les quatre séries, en dix minutes avec la toxine, en soixante minutes avec l'anatoxine.

Nous voyons donc que le cholestérol ne joue aucun rôle dans les propriétés floculantes du sérum antidiphtérique de Cheval. Il est intéressant de savoir si l'on obtient les mêmes résultats avec un système de précipitation spécifique différent. Nous avons étudié le couple sérum de Cheval-antisérum de Lapin, dans lequel on peut enlever le cholestérol, non seulement de l'anticorps, mais encore de l'antigène.

4° Système sérum de Cheval-antisérum de Lapin

Nous avons traité par le saponoside en présence d'éther, d'une part, du sérum de Cheval normal (antigène) et, d'autre part, toute une série d'antisérums correspondants de Lapin. Nous avons effectué, pour chaque sérum, les mêmes analyses que dans le paragraphe précédent, avec des résultats analogues. Il faut signaler cependant qu'avec le sérum de Lapin, l'extraction du cholestérol n'est jamais absolu-

ment complète et que le sérum traité soumis à la méthode de KUMAGAWA, cède aux solvants organiques de très faibles quantités de cholestérol, difficiles d'ailleurs à évaluer. Dans les mêmes conditions, la réaction de LIEBERMANN ne donne pas la moindre coloration verte avec l'extrait provenant du sérum de Cheval. En présence de saponosides, l'éther n'enlève que des traces infimes de phosphore lipidique aux deux sérums antigène et anticorps (*).

Nous avons effectué nos premiers essais en mélangeant simplement, en proportions variables, le sérum de Cheval à l'immunsérum de Lapin. Dans ces conditions, l'optimum de floculation est difficile à déterminer, et les phénomènes d'inhibition sont à leur maximun. Aussi, avons-nous rapidement adopté la méthode de DEAN et WEBB. En présence d'immunsérums très avides, et pour diminuer le nombre de tubes à examiner, nous avons pratiqué des dilutions de raison 3, parfois 4. Pour chaque sérum, quatre séries ont été étudiées :

a) Série témoin : antigène et anticorps non traités (C N-L N) ;

b) Sérum anticorps décholestérolé, antigène normal (C N-L D) ;

c) Sérum anticorps normal, antigène décholestérolé (C D-L N) ;

d) Absence complète de cholestérol (C D-L D).

Ici encore, nos résultats ont été très homogènes. Nous avons toujours constaté la floculation dans les quatre séries. Toutefois, le temps de floculation se montre légèrement supérieur dans la dernière série. On observe aussi, parfois, un très léger rétrécissement de la zone de floculation, se faisant dans la région d'excès d'antigène. Ces modifications sont toujours minimes et nous pouvons faire les mêmes

(*) Comme cela se produit d'ailleurs avec l'éther sans saponoside.

conclusions dans ce système antigène-anticorps que dans le précédent : l'absence de cholestérol ne modifie les propriétés floculantes ni de l'antigène, ni de l'anticorps. Nous résumerons nos travaux par les deux expériences suivantes :

Expérience I

Sérum de Lapin 11

ANALYSES EFFECTUÉES

		Sérum de Cheval	Sérum de Lapin
Extrait éthéré...	Phosphore....	0	Traces
	Cholestérol...	1,10 g.	0,70 g.
Kumagawa.....	Phosphore....	+++	+++
	Cholestérol...	0	0,10 g.

FLOCULATIONS

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T. min.
Sérum de Lapin au 1/2 (en cm³)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	»
Sérum de Cheval, 1 cm³ à la dilution.	1	1/3	1/9	1/27	etc.	....	....	....	....	....	»
L N-C N	F	F	F	F	**F**	F	F	F	F	O	30
L N-C D	F	F	F	F	**F**	F	F	F	L	O	32
L D-C N	F	F	F	F	**F**	F	F	F	L	O	32
L D-C D	L	F	F	F	**F**	F	F	F	L	O	35

Expérience II

Sérum de Lapin 12

ANALYSES

Pour l'analyse du sérum de Cheval, voir expérience précédente.

Sérum de Lapin

	Cholestérol	Phosphore
Extrait éthéré.....	0,60	Faibles traces
Kumagawa	0,10	+++

FLOCULATIONS

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T. min.
Sérum de Lapin au 1/2 (en cm³)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	»
Sérum de Cheval, 1 cm³ à la dilution.	1	1/3	1/9	1/27	etc.	....	....	....	....	....	»
L N-C N	F	F	F	F	**F**	F	F	F	F	F	15
L D-C N	F	F	F	F	**F**	F	F	F	F	F	16
L N-C D	L	L	F	F	**F**	F	F	F	F	O	16
L D-C D	L	L	L	F	F	**F**	F	F	F	L	18

Conclusions

Nous avons vu au début de ce chapitre le rôle important joué par les lipides dans l'insolubilisation du complexe antigène-anticorps. Nous avons démontré que le cholestérol n'est pas responsable de ces propriétés. Le sérum, privé de cette substance, se comporte vis-à-vis de l'antigène comme le sérum témoin. Donc, la méthode de décholestération de

Tayeau ne dénature pas les protéines, puisque ces dernières conservent leurs propriétés spécifiques initiales.

Si le cholestérol est hors de cause, ce sont probablement les phosphatides qui, parmi les substances lipoïdiques, interviennent pour modifier la solubilité du précipité spécifique. Il nous paraît intéressant de rapprocher cette conclusion des travaux de Horsfall et Goodner *(loc. cit.)* : ces auteurs ont montré que les sérums antipneumococciques de Cheval ou de Lapin, complètement délipidés, ont perdu l'aptitude de précipiter les polyosides correspondants, mais récupèrent ce pouvoir par addition de certains phosphatides. Rappelons aussi que les phosphatides sont capables de modifier fortement la solubilité de certaines fractions protéidiques : de nombreux auteurs [816, 339, 336, 344, 141], frappés par la richesse en lipides des euglobulines, pensaient que l'insolubilité dans l'eau pure des protéides est conditionnée par les graisses qui leur sont fixées. Le fait a été confirmé par Hartley [342] et, plus récemment, par Machebœuf et Tayeau [568] : ces auteurs ont noté que les euglobulines délipidées deviennent en majeure partie solubles dans l'eau. Or, Tayeau, en utilisant justement la technique dont nous nous sommes servi, a démontré que le cholestérol ne joue aucun rôle dans cette solubilité [893].

Pour enlever à un sérum son pouvoir floculant, il faut donc lui enlever ses phosphatides. Ceci n'est possible que grâce aux techniques que nous allons exposer maintenant.

B. — TECHNIQUES DE DÉLIPIDATION TOTALE APPLIQUÉES A LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE.

Nous avons vu que le sérum, privé en totalité de ses lipides, perd ses propriétés floculantes. Il est important de pratiquer cette délipidation dans des conditions telles que les protéines ne subissent aucune dénaturation.

1° Délipidation par la technique de Hardy et Gardiner (*)

Rappelons le principe de cette méthode :

On traite le sérum, préalablement refroidi à 0° C., par un excès d'alcool absolu à — 15° C. Il se forme un précipité que l'on lave à plusieurs reprises avec de l'alcool absolu très froid, en veillant à ce que la température ne soit jamais supérieure à — 10° C. On épuise le coagulum protéidique par l'éther anhydre froid, qui enlève l'alcool puis, enfin, par l'éther à température ordinaire, pendant plusieurs heures; ce dernier solvant enlève complètement les lipides détachés des cénapses par l'action de l'alcool. On obtient en définitive une poudre blanche qu'on sèche à l'air. On élimine les dernières traces d'éther en maintenant la poudre sous vide, puis on la dissout facilement dans l'eau : on reconstitue ainsi une solution parfaitement semblable au sérum primitif, mais totalement privée de lipides.

Dans un système précipitant sérum-antisérum, les deux agents contiennent des lipides; nous avons voulu savoir si les effets de la délipidation de l'anticorps ou de l'antigène s'avèrent identiques [899]. Nous avons traité par la technique de Hardy et Gardiner, modifiée par Hartley, du sérum de Cheval normal et trois sérums de Lapin anti-Cheval. Ces immunsérums possédaient une avidité différente : dans les conditions optima, ils précipitaient l'antigène respectivement en 2 ¼, 6 ¾ et 53 minutes, à la température du laboratoire. Pour chaque couple précipitant, nous avons réalisé les combinaisons suivantes :

L N-C N : Sérum de Lapin normal-sérum de Cheval normal;

L D-C N : Sérum de Lapin délipidé - sérum de Cheval normal;

L N-C D : Sérum de Lapin normal - sérum de Cheval délipidé;

L D-C D : Sérum de Lapin délipidé - sérum de Cheval délipidé.

La mesure de l'activité a été pratiquée en notant les temps de floculation, la quantité d'anticorps étant constante (1 cm³ d'une dilution au 1/8e). L'antigène est ajouté à la dose de

(*) [340].

1 cm³ d'une dilution croissante de raison 2. Nos résultats sont donnés par les trois tableaux suivants :

Sérum 71 (sérum très avide)

Temps de floculation exprimé en minutes.
F, Floculation le lendemain. — L, Louche le lendemain.

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L N-C N	25½	25½	11½	11½	13¾	12	18¼	2¼	6½	19	34	2 h. ¼
L D-C N	»	»	F	»	»	»	»	F	»	»	»	»
L N-C D	»	»	»	»	»	F	18	2½	10	21	38	4 h.
L D-C D	»	»	»	»	»	»	»	L	»	»	»	»

Sérum 210 (sérum moyennement avide)

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L N-C N	F	F	118	116	28	6¾	7	25	40	77	139	»
L D-C N	»	»	»	»	»	F	F	»	»	»	»	»
L N-C D	»	»	»	»	F	127	52	61	68	89	»	»
L D-C D	»	»	»	»	L	L	L	»	»	»	»	»

Sérum 410 (sérum peu avide)

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
L N-C N	»	»	»	»	F	54	53	65	119	4 h. ½	»	»
L D-C N	»	»	»	»	»	L	L	L	»	»	»	»
L N-C D	»	»	»	»	»	F	3 h. 59	3 h. 49	4 h. 19	»	»	»
L D-C D	»	»	»	»	»	L	L	»	»	»	»	»

De ces expériences, découlent les faits suivants :

a) La délipidation du sérum antigène amène un rétrécissement très important de la zone de floculation. Ce rétrécissement se fait surtout par augmentation de la zone d'inhi-

bition par l'antigène. D'autre part, le traitement entraîne un accroissement du temps de floculation.

b) La privation des lipides de l'immunsérum se traduit par un rétrécissement extrême de la zone de précipitation. On peut même, avec un sérum de Lapin peu avide, n'obtenir qu'un simple louche au bout de vingt-quatre heures.

c) La délipidation simultanée des deux sérums provoque la disparition complète des floculats; on note toutefois encore une opalescence dans la région des proportions optima.

d) Les résultats obtenus, s'ils ont la même allure générale dans les trois expériences, dépendent beaucoup, en valeur absolue, de l'avidité du sérum. Les sérums peu avides fournissent des zones de floculation d'autant plus étroites.

e) Notons que, dans l'un des systèmes (sérum 71), nous avons deux zones de proportions optima dues à l'hétérogénéité du mélange injecté. La délipidation de l'antigène a fait complètement disparaître une de ces zones. On les retrouve, au contraire, lorsqu'on ne délipide que l'anticorps.

Interprétation des résultats

Le rétrécissement de la zone de floculation, ainsi que l'augmentation du temps de floculation, s'expliquent assez aisément. Nous avons déjà signalé que les lipides apportent aux protéines qui les supportent, des radicaux hydrophobes dus en majeure partie aux longues chaînes méthyléniques apolaires des acides gras. C'est ainsi que les euglobulines, riches en lipides, sont insolubles dans l'eau; la délipidation leur confère des caractères de pseudoglobulines.

Lorsque l'union entre l'antigène et l'anticorps se produit, les deux constituants vont donner au complexe qui se forme leurs caractères propres de solubilité. La combinaison d'un anticorps et d'un antigène délipidés aura donc tendance à rester en solution. Les lipides n'agissent donc pas sur l'union

elle-même de l'anticorps à l'antigène (première phase), mais interviennent dans le deuxième temps de la réaction, où ils modifient le phénomène macroscopique de précipitation.

Dans les zones d'excès d'antigène ou d'anticorps, les complexes formés sont de petite taille (fig. 13, p. 114). La combinaison antigène-anticorps possède une solubilité voisine de celle des éléments qui la constituent. Cette solubilité va croître lorsqu'on délipide l'antigène ou l'anticorps, et surtout les deux à la fois. On n'observe donc pas de floculation dans ces régions extrêmes, d'où rétrécissement de la zone de précipitation. La zone de floculation est très étroite chaque fois qu'il s'agit d'un anticorps pseudoglobulinique (type H, p. 99). Bien plus, Polonovski, Faure et Machebœuf [724], transformant une euglobuline anticorps en pseudoglobuline par délipidation, constatent en même temps que la largeur de la zone de floculation diminue.

Dans la zone d'équivalence, la combinaison antigène-anticorps forme un réseau de dimensions plus importantes : dans ces conditions, une grande partie des fonctions hydrophiles, libérées par le départ des lipides, sera masquée à l'intérieur du complexe et n'aura plus aucune influence; seules les fonctions hydrophiles situées à la surface du réseau ou au voisinage de cette surface, augmenteront la solubilité du complexe; selon la proportion de ces fonctions hydrophiles par rapport aux fonctions hydrophobes, on observera, ou bien une précipitation plus ou moins retardée (délipidation de l'antigène ou de l'anticorps) ou bien même une absence totale de floculation (délipidation double).

Il est, au contraire, assez difficile d'expliquer la différence assez importante entre la délipidation de l'antigène et celle de l'anticorps, les deux sérums ayant des teneurs en graisse assez voisines.

Pour la même proportion d'antigène et d'anticorps, le temps de floculation sera d'autant plus réduit que l'immunsérum est plus avide pour l'antigène. Cette avidité est probablement due au plus grand nombre de motifs spécifiques

sur la surface de la molécule d'anticorps. Avec un immunsérum avide, une molécule d'anticorps sera entourée de plusieurs molécules d'antigène qui, à leur tour, capteront de nouvelles molécules d'anticorps. Il se formera donc, rapidement, un volumineux réseau dans lequel les fonctions hydrophiles seront masquées. Tout se passe donc comme si l'on était dans la zone d'équivalence. On sait, en effet, que les sérums avides, provenant d'animaux hyperimmunisés, ont une zone d'équivalence beaucoup plus étendue [382, 416]. Avec un sérum peu actif, l'agrégat reste de petite taille, et les fonctions hydrophiles peuvent manifester entièrement leur action.

La technique de Hardy et Gardiner a l'inconvénient de nécessiter l'obtention d'une température très basse (— 15° C.), à laquelle doivent s'effectuer toutes les manipulations. Elle est délicate à réaliser quand on ne dispose, ni de chambre froide, ni de centrifugeur réfrigéré. C'est pourquoi nous avons cherché s'il existait une technique permettant à la fois l'extraction totale des lipides et l'absence complète de dénaturation des protéines.

2° Délipidation par la méthode de Delsal

Delsal a proposé, récemment [176], un nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal. Ce corps, excellent solvant organique [243], déjà proposé par Charonnat en vue de l'extraction du cholestérol sérique [136], coagule énergiquement les protéines [581] ; à température ordinaire, le méthylal, additionné de 20 p. 100 de méthanol, extrait quantitativement les lipides sériques. Delsal signale que les protéides, délipidés par le méthylal, peuvent se dissoudre dans le même volume d'eau distillée que le volume initial du sérum. Nous avons voulu étudier le pouvoir précipitant de telles solutions protéidiques.

a) *Préparation des sérums*

Nous avons traité, d'une part, du sérum antidiphtérique de Cheval, d'autre part, du sérum de Cheval normal et deux sérums de Lapin anti-Cheval, par la technique de DELSAL.

Un volume de sérum étudié est additionné de deux volumes du mélange méthylal-méthanol; il se produit un précipité abondant; on agite et, après quelques minutes de repos, on centrifuge. Le culot est alors épuisé trois fois par ce même mélange délipidant. On le lave ensuite, à deux reprises, avec de l'éther anhydre, qui chasse le méthylal. On chasse à son tour l'éther en remuant la poudre blanche obtenue sous un jet d'azote, puis en la soumettant à un vide poussé. On redissout cette poudre, avec assez de difficultés d'ailleurs, dans un volume d'eau physiologique double du volume initial du sérum; cependant, après une ou deux heures de repos, la solution est devenue parfaitement limpide. Nous avons vérifié que cette solution ne contient plus de lipides.

b) *Pouvoir précipitant du sérum antidiphtérique délipidé*

Nous avons comparé le pouvoir floculant du sérum initial (additionné de son volume d'eau physiologique) et de la solution délipidée.

Expérience

Sérum 77

Temps de floculation en minutes.

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Toxine 45 U. cm³.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
Anticorps, cm³. . .	0,22	0,28	0,34	0,38	0,42	0,46	0,54	0,62	0,30	0,80	0,70	1
Sérum normal . .	»	»	20	15	20	22	»	»	»	»	»	»
Sérum délipidé . .	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»

Même après vingt-quatre heures de séjour au bain-marie à 37° C., on ne constate pas de précipité avec le sérum délipidé. On observe cependant, dans le tube 4, correspondant à la primofloculation, une légère opalescence. Donc, le sérum,

privé de ses lipides par le méthylal, a perdu ses propriétés floculantes, tout comme le sérum traité par la méthode de Hardy et Gardiner. Bien plus, comme ce dernier, il retarde la précipitation et réduit la zone de floculation d'un sérum normal auquel on le mélange. Il ne modifie cependant pas le point de primofloculation. Ceci est sensible dès la proportion de 0,4 cm³ de sérum délipidé pour 2 cm³ de sérum normal. Pour des proportions plus élevées, on n'observe plus de floculation.

L'absence de précipitation observée peut être mise sur le compte de l'extraction des lipides. Malgré cette modification, la réaction antigène-anticorps a-t-elle lieu ? On pourrait considérer l'opalescence obtenue dans le tube correspondant à la primofloculation comme le témoin de la combinaison spécifique. Il est autrement plus intéressant d'étudier le pouvoir neutralisant du sérum ainsi délipidé.

c) *Pouvoir antitoxique du sérum antidiphtérique délipidé*

Nous avons réparti six Cobayes de même poids en trois groupes :

α. Les deux animaux du premier groupe ont reçu, dans le péritoine, chacun 0,5 cm³ du mélange contenu dans le tube 4 de l'expérience précédente (sérum entier; mélange correspondant à la primofloculation). Ces animaux n'ont présenté aucun trouble;

β. Deux autres Cobayes ont reçu 0,5 cm³ d'un mélange de 2 cm³ de toxine et de 0,38 cm³ d'eau distillée; ce mélange a séjourné vingt-quatre heures au bain-marie (*). Les animaux sont morts au bout de dix-huit heures;

γ. Enfin, les deux derniers Cobayes ont reçu 0,5 cm³ du mélange toxine-sérum délipidé correspondant à la neutralité. Ces animaux sont morts entre la cinquantième et la cinquante-cinquième heure.

(*) Pour éliminer la dénaturation éventuelle de la toxine par un séjour de vingt-quatre heures à 37° C.

Nous voyons donc que le traitement du sérum par le méthylal a dénaturé l'antitoxine qui n'est plus capable de neutraliser exactement la toxine correspondante. Cette dénaturation est cependant assez faible, puisque les animaux sont morts beaucoup plus lentement que les témoins : il est possible que l'union antigène-anticorps se soit réalisée, mais que le complexe ainsi formé se trouve être beaucoup moins stable que celui obtenu avec le sérum normal.

L'inhibition qu'apporte le sérum traité à la floculation du sérum normal est aussi en faveur de la réalité de la combinaison anticorps délipidé-toxine. Si l'antitoxine avait complètement perdu ses caractères spécifiques, la précipitation ne se ferait pas dans le mélange correspondant à la primofloculation du sérum témoin : ce dernier fait indique que les unités floculantes sont fournies à la fois par le sérum normal et par le sérum délipidé (*).

Cependant, la méthode au méthylal ne peut remplacer la technique de Hardy et Gardiner, qui ne modifie en rien les propriétés antitoxiques et curatives du sérum antidiphtérique.

3° Délipidation par la technique de Piettre

Peut-on utiliser, cependant, une autre technique que celle de Hardy et Gardiner, dont nous avons signalé les difficultés de réalisation pratique ?

Piettre a montré, il y a déjà quelques années [715], que l'acétone anhydre, à la température de — 5° C., précipitait les protéines sans les dénaturer. Le coagulum ainsi obtenu

(*) Nous avons constaté également qu'un sérum de Lapin traité par le méthylal conserve son pouvoir d'agglutiner les hématies humaines. D'autre part, nous avons fait quelques expériences de délipidation, au moyen de la méthode de Delsal, de l'anticorps et de l'antigène dans la réaction sérum de Cheval-antisérum de Lapin. On peut encore avoir un floculat par délipidation du sérum de Cheval seulement. Lorsqu'on enlève les lipides de l'immunsérum ou des deux agents à la fois, on n'observe plus de précipité, mais néanmoins l'existence d'un louche net dans la région des proportions optima. Ce dernier fait tendrait à prouver, lui aussi, que la dénaturation n'est pas totale .

cède à l'éther la majeure partie de ses lipides. Cette technique, employée ensuite par Adnot [17], a été récemment utilisée et modifiée par Saïas [814]. Son intérêt vient de ce qu'elle ne nécessite pas l'obtention de températures très basses : on arrive très aisément, avec un simple mélange réfrigérant, à maintenir constamment les produits à une température inférieure à — 5° C.

Nous avons suivi, pour traiter nos sérums, le protocole suivant :

10 cm³ de sérum sont amenés à la température de la glace fondante, puis on les verse rapidement dans 25 cm³ d'acétone anhydre à — 10° C., contenus dans un tube à centrifuger; on agite, on porte rapidement les tubes dans leurs supports métalliques refroidis à — 15° C., puis on centrifuge à 2.500 tours pendant trente secondes. Cette brève centrifugation suffit à séparer le précipité de protéines, et l'on peut constater que l'acétone qui surnage n'a pas dépassé la température de — 4° C. L'acétone est décantée par renversement du tube, et le précipité lavé à deux reprises par 15 cm³ d'acétone à — 10° C. On termine par quatre extractions du coagulum à l'éther, à froid pour les deux premières, à température ordinaire pour les deux autres, la séparation des protéines s'effectuant toujours par centrifugation.

L'éther est ensuite éliminé par un courant d'azote, puis par le vide. La poudre obtenue se dissout assez facilement dans l'eau.

a) *Sérum antidiphtérique*

Nos résultats sont analogues à ceux obtenus par délipidation par la technique de Hardy et Gardiner. Le sérum, traité par l'acétone et par l'éther, perd complètement ses propriétés floculantes. Le mélange de sérum normal et de sérum délipidé flocule beaucoup plus lentement, mais la zone des proportions optima est la même.

Voici les temps de primofloculation observés dans une expérience *(sérum 280,* de 300 U. A.; toxine, 45 U.) :

Sérum non traité	20 min.
Sérum non traité, 4 cm³	26 min.
Sérum délipidé, 0,4 cm³	
Sérum non traité, 2 cm³	92 min.
Sérum délipidé, 2 cm³	

b) *Système sérum de Cheval-antisérum de Lapin*

Nous avons ici, comme précédemment, effectué à la fois la délipidation des sérums antigène et anticorps, et nous avons réalisé les quatre combinaisons possibles d'antigènes et d'anticorps, normaux ou délipidés. Les résultats ont été différents selon que l'antisérum examiné floculait lentement ou rapidement le sérum de Cheval.

Lorsque le sérum de Lapin est peu avide, on note un retard à la floculation, assez net, tandis que la zone de précipitation se réduit aux tubes voisins de la région des proportions optima. Ceci se produit lorsqu'on délipide le sérum de Cheval ou le sérum de Lapin, mais surtout dans cette dernière éventualité. Lorsqu'on prive à la fois de lipides les deux sérums, on observe une opalescence plus ou moins marquée.

Lorsque l'immunsérum précipite rapidement l'antigène, la délipidation d'un seul constituant du système n'amène que peu de modifications : légère augmentation du temps de floculation, rétrécissement peu accentué de la zone de précipitation. Malgré la délipidation des deux sérums, on observe la précipitation dans la région des proportion optima.

Ces résultats sont, en somme, analogues à ceux que nous avons obtenus avec la méthode de Hardy et Gardiner : ils sont moins tranchés, car ici la délipidation n'est jamais complète. Comme nous l'avons nous-même vérifié, lorsqu'on utilise la technique à l'acétone-éther, 15 à 20 p. 100 des lipides restent toujours fixés aux protéines [796, 793].

Nous avons montré que le cholestérol n'intervient pas dans le phénomène de la floculation. La possibilité d'obtenir encore une précipitation avec des sérums traités par la méthode de Saïas nous montre que, parmi les lipides restant, tous ne jouent pas le même rôle dans l'insolubilisation du complexe spécifique. Les différentes graisses du sérum ne sont pas toutes fixées avec la même force par les protéines,

et les différentes cénapses sont plus ou moins facilement décomposées. Il semble donc que ce soient les lipides qui sont liés aux protéines pour former les cénapses les plus stables qui interviennent au premier chef dans la modification des caractères de solubilité de ces protéides.

CONCLUSIONS DU SECOND CHAPITRE

a) Le sérum antidiphtérique, entièrement privé de lipides (Hardy et Gardiner), ou un sérum qui ne conserve que 15 à 20 p. 100 de ses lipides initiaux (Pietre), perd ses propriétés floculantes tout en gardant ses propriétés antitoxiques, si la technique employée a été suffisamment douce. Le cholestérol ne joue aucun rôle dans ce pouvoir floculant, qui est probablement dû aux phosphatides.

b) Dans un système où les deux constituants contiennent des lipides (sérum de Cheval-antisérum de Lapin), la délipidation du sérum antigène amène un retard à la précipitation et un rétrécissement de la zone de floculation; la délipidation du sérum anticorps provoque, soit un très grand rétrécissement, soit même la disparition de la floculation. Suivant que l'on a affaire à un sérum très avide ou peu avide, la délipidation totale des deux sérums est nécessaire ou non, si l'on veut obtenir la suppression complète de la floculation. Ici encore le cholestérol, fixé aux protéines, ne joue aucun rôle dans le phénomène de floculation. Ce sont les lipides des cénapses les plus solides qui modifient la solubilité du complexe antigène-anticorps, et amènent ainsi la précipitation.

c) Seule la méthode de Hardy et Gardiner permet à la fois de respecter intégralement l'édifice protéique et de délipider totalement un sérum. La technique à l'acétone-éther (Pietre) ne semble pas dénaturante, mais respecte une partie des lipides cénapsés. La technique au méthylal de Delsal, qui permet une délipidation complète, dénature légèrement les protéines qui, dans le cas du sérum anti-

diphtérique, ont perdu une partie de leur pouvoir antitoxique.

Nous avons vu, au cours de ce chapitre, l'influence prépondérante du caractère de solubilité des agents en présence sur l'apparition du précipité spécifique. Ici, la modification de solubilité était amenée par soustraction de composants normaux du sérum.

Nous allons maintenant étudier, dans le chapitre suivant, les modalités d'une réaction de floculation spécifique où l'antigène, ou l'anticorps, ou ces deux éléments à la fois, ont été soumis à l'action d'un produit chimique qui réagit énergiquement avec les protéines et qui leur confère de nouveaux caractères de solubilité.

CHAPITRE III

ACTION COMPARÉE DU FORMOL SUR L'ANTIGÈNE ET SUR L'ANTICORPS DANS LA RÉACTION SÉRUM DE CHEVAL-ANTISÉRUM DE LAPIN.

Le formol, premier terme de la série des aldéhydes aliphatiques, est trop connu pour que nous nous étendions sur ses propriétés chimiques et sa grande réactivité.

Avant d'exposer l'étude expérimentale que nous avons faite de son interférence dans la réaction de précipitation spécifique, nous rappellerons cependant quelques points concernant son action sur les aminoacides et sur les protéines, en insistant surtout sur son action vis-à-vis du sérum sanguin. Nous passerons ensuite en revue les travaux immunologiques où l'action du formaldéhyde a été étudiée.

I. — GÉNÉRALITÉS

A. — ACTION DU FORMOL SUR LES AMINOACIDES ET SUR LES PROTÉINES

C'est Blum qui, le premier [68], a étudié les propriétés de certaines protéines soumises à l'action du formol. L'ovalbumine et la sérumglobuline, traitées par ce produit, deviennent des « méthylalbumines » de propriétés différentes : leurs solutions ne coagulent plus par la chaleur, et donnent, avec l'alcool, l'acétone ou les acides, des précipités qui se

redissolvent dans l'eau. Ces résultats furent confirmés par Bach [36].

La même année, Benedicenti [52] signalait que, sous l'influence du formol, la gélatine devient insoluble, le sérum sanguin se gélifie, la fibrine et la caséine ne se gonflent plus par l'eau et ne peuvent plus être artificiellement digérées. Depuis ces mémoires initiaux, un très grand nombre de travaux ont été consacrés à l'action de l'aldéhyde formique sur les propriétés physicochimiques du sérum sanguin ou des protéines en solution (*). Nous en dégagerons les points principaux.

a) Sous l'influence du formol, on observe tout d'abord une augmentation progressive de la viscosité du sérum qui devient épais, puis finit par se prendre en gel [850, 236, 648]. Cette « *Formogel reaction* » ou encore « *Formolgélification* » se produit lorsqu'on ajoute quelques gouttes de la solution commerciale de formol (**) à 1 cm³ de sérum. Elle se produit lentement, la prise en masse du sérum se faisant en général au bout de plusieurs heures. Elle est plus rapide à 37° C. [112] et gênée par la dilution [60, 61, 390]. La réaction est irréversible, et la gelée obtenue ne se dissout pas dans l'eau physiologique. La gélification s'obtient avec les sérums d'animaux de toutes les espèces [62, 25], plus facilement après vieillissement à la glacière [696]. Elle est surtout évidente avec les sérums pathologiques provenant de sujets syphilitiques [292, 511, 227, 112] ou atteints de Kala-Azar [635, 143]. La sérum albumine n'est pas responsable de la gélification [64, 950, 636] qui se produit avec la sérumglobuline [477, 973]. Les réactions de formolgélifica-

(*) Une étude générale de cette question a été récemment publiée par French et Edsall [278]. Nous ne parlerons pas de l'action du formol sur les protéines fibrillaires dont l'importance est cependant considérable pour les industries du tannage des cuirs et le durcissement de différentes fibres et matières plastiques. De nombreuses communications ont paru à ce sujet, ces dernières années, dans le *Journal of the American Leather Chemical Association.*

(**) Contenant 30 à 40 p. 100 d'aldéhyde formique.

tion n'ont donc aucun caractère de spécificité, mais s'observent dans toutes les hyperglobulinémies [525]. La sérum-albumine, au contraire, joue un rôle protecteur vis-à-vis de la gélification (Strauss et Kunitz [875]). D'après ces derniers auteurs, le fibrinogène se prendrait en masse en présence de formol. Cependant, Devouassoux [195] a montré que la coagulation sanguine et la rétraction du caillot s'effectuent normalement en milieu formolé.

b) Tandis que le sérum se gélifie, sa couleur se modifie : il prend une teinte verdâtre, plus ou moins fluorescente [236, 648]. D'autres protéines, comme les toxines bactériennes, deviennent également fluorescentes sous l'influence du formol [196, 540].

c) Les protéines ainsi traitées présentent une solubilité modifiée, le plus souvent diminuée. Schwartz [850] avait signalé qu'une solution de sérum albumine, additionnée de quelques gouttes de formol, précipite par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Ce point a été confirmé par Henley [390] : selon cet auteur, après addition de formol, les albumines se comportent comme des pseudoglobulines, celles-ci commes des euglobulines et, enfin, ces dernières comme des protéines de solubilité encore moindre. Tous ces travaux ont été repris et complétés, il y a quelques années, par Mascré et Herbain [595-597]. Les protéines sériques formolées qu'ils obtiennent sont beaucoup moins solubles que les protéines natives en présence d'acide trichloracétique, de sulfate sodique ou ammonique, d'acétone ou d'alcool froid. Les résultats sont tout à fait superposables avec les protéines du lait [598].

d) Enfin, les protéines formolées ont une stabilité tout à fait remarquable à la chaleur et ne coagulent plus, quelles que soient la durée du chauffage et la température à laquelle elles sont portées. L'action du formol est, à ce point de vue, instantanée et persiste même si l'on neutralise l'ac-

tion du formol avec de l'ammoniaque [108, 784] (*). Remarquons que cette stabilité au chauffage n'est pas spéciale au formol, mais peut être obtenue avec des substances non aldéhydiques, comme le glycérol [865] ou la pyridine [866].

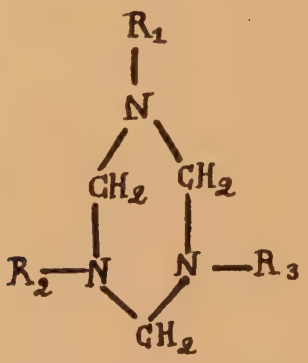
Comment expliquer toutes les modifications importantes que subissent les protéines traitées par le formol ? La question est encore loin d'être résolue mais, cependant, plusieurs points sont solidement établis. Le formol, s'il agit sur les protéines, agit également sur les constituants de l'édifice protéidique que sont les aminoacides.

Schiff [833] et Schwarz [850], à la fin du siècle dernier, avaient montré que le formaldéhyde pouvait s'unir au groupement aminé des aminoacides, leur conférant ainsi des propriétés acides nettes. On sait tout le parti qu'a tiré Sörensen [869] de cette action pour le dosage des acides aminés en solution aqueuse. Ces différents auteurs pensaient que les nouvelles propriétés des *méthylalbumines* étaient justement dues à l'apparition de ce caractère acide. C'est ainsi que des coupes histologiques, que l'on traite par un indicateur coloré convenable, se teintent différemment si elles ont été fixées ou non par le formol; dans le premier cas, elles sont beaucoup plus acides [990]. Des études potentiométriques plus récentes ont permis de confirmer les modifications de *p*H isoélectrique des protéines formolées [456, 118-120, 207]. L'action sur les fonctions aminées est primordiale, puisque la désamination préalable supprime l'action du formol [518]. Cependant, la formation du dérivé méthylénique est rapide, presque immédiate, alors que les phénomènes que nous avons cités plus haut se réalisent en général assez lentement. Une simple acidification par blocage des fonctions aminées ne peut expliquer ni l'augmentation de la viscosité, ni la gélification, ni l'apparition de la fluorescence.

Il semble, en effet, que l'action du formol sur les amino-

(*) Les protéines formolées, étalées en lame mince, occupent une surface plus grande que les protéines natives [190].

acides soit beaucoup plus complexe : l'aldéhyde réagit non seulement avec le groupement — NH_2 pour donner un radical — N = CH_2, mais encore peut unir en un cycle hexagonal trois résidus d'aminoacides pour donner des trimères cycliques du type suivant (Sprung [871]) :



Les radicaux imine, amide, peptide [476], guanidine [275], hydroxyle, carboxyle, sulfhydrile [718], peuvent aussi, dans certaines conditions, se combiner au formol.

L'action du formaldéhyde sur les aminoacides cycliques est particulièrement intéressante. Dès 1912, Homer [404], puis Wellisch [963] avaient isolé, sous forme cristallisée, le produit résultant de la condensation du tryptophane avec le formol. Jacob et Craig [437] ont montré que ce dérivé contient un cycle supplémentaire. Des composés polycycliques analogues peuvent aussi se former aux dépens de la phénylalanine [714] et de l'histidine [401, 952]. L'existence de ces dérivés a été encore récemment confirmée [942, 44, 641]. Ces nouveaux cycles expliqueraient en particulier la fluorescence des protéines formolées. Leur formation serait assez lente. Elle peut être suivie par des méthodes polarimétriques [284] (*).

(*) Loiseleur [529] a pu montrer, avec cette technique, que la cyclisation se faisait le plus facilement avec le tryptophane, puis avec la tyrosine, la phénylalanine, moins facilement avec la lysine et, enfin, avec l'acide glutamique, la leucine et l'alanine.

L'augmentation de la viscosité serait due à la création de ponts méthyléniques *(cross-linkings)* entre les résidus d'aminoacides d'une même chaîne peptidique [275] ou de chaînes différentes [912] (*).

Donc, l'action du formol sur les protéines serait double :

— Action immédiate de méthylénisation, par blocage des fonctions aminées;

— Action lente de cyclisation et de condensation. Cette action secondaire va remanier l'édifice protéidique. Elle est d'autant plus importante que la concentration en formol est plus grande; elle se fait progressivement, en impressionnant d'abord les aminoacides facilement cyclisables.

Si le mécanisme d'action de l'aldéhyde formique reste encore obscur, depuis longtemps déjà les immunologistes ont étudié l'action de ce produit sur les antigènes et sur les anticorps.

B. — ACTION DU FORMOL SUR LES RÉACTIFS IMMUNOLOGIQUES

Les antigènes et les anticorps sont de nature protéidique : aussi, leur formolisation va présenter certaines particularités qui reflètent les données que nous venons de voir au sujet des protéines formolées.

1° Action sur les antigènes

Dès 1907, Rosenau et Anderson [797] signalaient que les propriétés antigéniques et anaphylactisantes des sérums formolés étaient voisines de celles des sérums naturels. Quelques années plus tard, en 1912, Von Eisler et Löwenstein [236] confirmaient ces premières expériences. Réfutant le travail d'Obermayer et Willheim [665], Landsteiner, avec Jablons [485], puis avec Lampl [488], démontrait que le formol ne peut créer une nouvelle spécificité dans la molécule protéidique : le sérum d'un animal

(*) L'existence de ces liaisons a d'ailleurs été fort contestée [125].

préparé avec du sérum de Lapin formolé ne réagit qu'avec cet antigène, formolé ou non, et ne floculе pas les sérums de Cheval, de Porc ou de Poulet traités par l'aldéhyde formique (*). Dans un travail plus récent, Horsfall [422] a pu obtenir des réactions croisées faibles, mais positives, entre protéines formolées d'espèces différentes. Les quantités de sérum qu'il employait pour modifier l'antigène étaient faibles, mais l'action très prolongée de cet agent amenait une véritable gélification. Ces derniers résultats n'ont été confirmés ni par Jacob [438], ni par Kleczkowski [462].

L'intérêt des travaux précédents était purement théorique : il n'en est pas de même de la géniale découverte de Ramon. A la suite de recherches entreprises au cours des années 1922 et 1923 sur le phénomène de floculation, cet auteur présentait à l'Académie des Sciences une communication [751] sur les propriétés de la toxine diphtérique soumise à l'influence combinée du formol (4 cm³ de la solution d'aldéhyde par litre de bouillon diphtérique) et de la chaleur modérée (38° C. pendant un mois). La toxine, traitée de la sorte, gardait complètement ses propriétés antigéniques initiales. Son pouvoir précipitant vis-à-vis de l'antisérum persistait (**). Mais surtout la nocivité de la toxine, modifiée par le formol, était complètement abolie (***) : la toxine était transformée en *anatoxine*, produit d'immunisation artificielle incomparable.

Le principe des anatoxines et des vaccinations antitoxiques était fondé. Très rapidement, d'autres anatoxines furent découvertes : anatoxines tétanique, botulinique, staphylococcique, anatoxine correspond aux germes de la gangrène gazeuse, etc. Cette méthode générale, permettant de transformer à volonté les antigènes les plus toxiques en

(*) Il est cependant possible de susciter chez le Lapin des anticorps par injection de protéines formolées provenant d'un animal de la même espèce [485].

(**) Les temps de floculation observés sont cependant plus grands, indiquant une légère baisse dans l'affinité pour l'antitoxine [725].

(***) Voir [638].

antigènes inoffensifs, entrait bientôt dans le domaine de la thérapeutique préventive et même curative (séro-anatoxithérapie) (*).

Les anatoxines de Ramon présentent, en outre, certaines modifications physicochimiques : elles sont résistantes à la chaleur; leurs propriétés antigéniques persistent après une heure de chauffage, alors que la toxine est complètement détruite dans des conditions analogues [752]. Cette résistance apparaît d'ailleurs progressivement au cours de la préparation de l'anatoxine [753]. L'anatoxine est aussi plus stable vis-à-vis de différents réactifs chimiques : elle est moins sujette à précipiter en milieu acide et, contrairement à la toxine, n'est pas dénaturée par l'acétone [226]. Signalons encore que l'action du formol sur les toxines microbiennes est irréversible : on ne peut, par aucun traitement, restituer à l'anatoxine les propriétés nocives de la toxine initiale [759].

Quel est le mécanisme de la transformation de la toxine en anatoxine ?

Certains auteurs pensent que le simple blocage des fonctions aminées par le formol suffit à expliquer les nouvelles propriétés observées [841, 953]. La toxine diphtérique se fixerait sur le tissu nerveux par ses fonctions aminées; cette fixation ne pourrait plus avoir lieu quand ces groupements polaires sont transformés en groupements apolaires méthyléniques. Cette altération légère ne modifie pas, ou modifie peu les motifs antigéniques spécifiques de la protéine : l'anatoxine provoque donc l'élaboration d'anticorps avec autant de facilité que la toxine. L'importance du blocage des fonctions aminées est encore mise en évidence par un travail d'Eaton [226] : il faut une plus grande quantité de formol pour détoxifier le filtrat microbien à *p*H 6 qu'à *p*H 9; en milieu acide, en effet, les fonctions aminées sont dissociées en plus grand nombre. La transfor-

(*) Consulter à ce sujet [761, 764, 765, 771].

mation de la toxine en *toxoïde* inoffensif peut encore être obtenue avec d'autres aldéhydes (*) qui réagissent, eux aussi, sur les fonctions aminées [58].

Cependant, la transformation progressive et lente de la toxine en anatoxine s'accorde mal avec la réaction de méthylénisation rapide. Remarquons aussi que, dans l'anatoxine, une grande partie des fonctions aminées reste libre [394, 840, 678], comme dans les protéines soumises à l'action du formol [277]. Il est vrai que le dosage chimique évalue la totalité des fonctions aminées libres de la molécule; or, il est probable que seul un petit nombre d'entre elles participe à la formation des motifs responsables des caractères spécifiques des toxines. D'autre part, différents agents qui se combinent aussi aux fonctions aminées libres, se comportent différemment du formol : le cétène [308] fait disparaître à la fois les pouvoirs toxique et antigénique, tout en conférant aux protéines traitées une nouvelle spécificité [309, 310]. Il en est de même du phénylisocyanate [417, 462], de l'isothiocyanate et du sulfure de carbone [943].

Comme pour les protéines, l'action du formol est double : le blocage immédiat des fonctions aminées est suivi d'une modification lente de la structure de l'édifice protéique, probablement due à la cyclisation de certains aminoacides (**). L'addition au poison microbien d'acides aminés aptes à se cycliser, comme le tryptophane [943] ou l'histidine [954], empêche d'ailleurs la transformation de la toxine en anatoxine. Pour chaque toxine, il y a des conditions optima de détoxification [214] : des concentrations en formol trop importantes, un chauffage trop prolongé déna-

(*) Ainsi d'ailleurs qu'avec d'autres substances aldéhydiques. Mais jamais la détoxification n'est totale sans diminution simultanée du pouvoir antigène. Schmidt [840], étudiant l'action de 200 substances sur la toxine diphtérique, n'en trouve pas une dont l'action soit comparable en tout point à celle du formol. Vincent [946] a donné à ces toxines, de nocivité plus ou moins réduite et conservant encore un certain pouvoir antigène, le nom de *Cryptotoxines*. Voir aussi [939, 947].

(**) C'est cette action secondaire qui explique les nouvelles propriétés de l'anatoxine : stabilité, fluorescence, etc.

turent profondément la protéine et amènent bientôt la disparition de son pouvoir antigène, qui persiste tant que la structure initiale n'est pas trop bouleversée. Les anatoxines sont donc des toxines à la limite de la dénaturation (Loiseleur). En l'absence de tout produit chimique, une toxine, soumise au simple vieillissement aseptique, perd aussi progressivement, et dans l'ordre suivant, ses pouvoirs toxique, précipitant et antigénique.

Les exotoxines microbiennes ne sont pas les seuls antigènes susceptibles d'être ainsi détoxifiés par le formol. Tous les antigènes toxiques subissent une action analogue, s'ils sont toutefois de nature protéidique : le formol ne modifie pas les endotoxines glucidolipidiques [76]. Les bactéries, soumises à l'action de ce produit, perdent complètement leur virulence, alors que leur pouvoir antigénique spécifique demeure inaltéré : de nombreux vaccins microbiens sont des vaccins formolés. L'aldéhyde formique agit semblablement sur les venins [29], et les anavenins [327, 133, 70] ont permis la préparation de sérums antivenimeux très actifs. Les toxines végétales, dans les mêmes conditions, perdent leur toxicité : l'abrine complètement [753], la ricine partiellement seulement, tandis qu'une partie de son pouvoir antigène est altérée [396]. Les virus filtrants, sous l'action du formol, perdent toute activité, mais peuvent encore susciter l'élaboration d'anticorps spécifiques : Vallée l'a montré pour le virus de la fièvre aphteuse [938], Zinsser pour les Rickettsia du typhus [993]. Mais c'est surtout depuis l'isolement des protéines virus à l'état cristallisé (Stanley [872]) que les travaux se sont développés dans cette voie. Les expériences précédentes ont été confirmées pour les virus de l'encéphalomyélite équine [47], de la leucopénie maligne du Chat [139], de l'influenza [397, 873], etc. (*).

(*) Le virus de la mosaïque du Tabac, par exemple, complètement inactivé par le formol, conserve encore 60 p. 100 de son azote aminé initial. Pour une dose égale de formol, l'inactivation est plus faible à *p*H 6 qu'à

En résumé, nous voyons que les antigènes, soumis à l'action du formol, subissent des modifications importantes, puisque leur toxicité, quand elle existe, est complètement supprimée. Les propriétés antigéniques, au contraire, ne sont l'objet que de variations minimes : l'affinité pour l'antisérum est simplement légèrement diminuée (*).

L'action du formol sur les anticorps est-elle superposable ? C'est ce que nous allons voir dans les paragraphes suivants.

2° Action sur les anticorps

L'action du formol sur les anticorps a donné lieu à bien moins de travaux que son action sur les antigènes.

C'est encore, ici, Von Eisler et Löwenstein [236] qui ouvrirent la voie en montrant, dès 1911, qu'un sérum formolé conserve son pouvoir de neutraliser spécifiquement les exotoxines; la fonction amboceptrice des sérums bactériolytiques et hémolytiques, les agglutinines et les précipitines sont, au contraire, fortement diminuées. Les auteurs avaient déjà remarqué que c'était surtout la seconde phase de la réaction antigène-anticorps qui était perturbée, puisque l'agglutinine se combinait spécifiquement à l'agglutinogène.

En 1915, pendant le premier conflit mondial, la récolte, la mise en flacons et le transport de quantités considérables

---

*p*H 7, et marche parallèlement à la diminution de la coloration obtenue avec la ninhydrine ou le réactif de Folin [800]. L'anavirus, contrairement aux anatoxines, peut être réactivé, du moins partiellement, par dialyse à *p*H 3.

(*) La quantité d'azote par unité de floculation est sensiblement la même pour les toxines et les anatoxines [266]. Avec un antigène différent, Kleczkowski trouve que le rapport $\frac{\text{antigène formolé}}{\text{précipité total}}$ est plus faible que le rapport équivalent obtenu avec les protéines natives. Le pouvoir de combinaison *in vivo* serait également réduit [462].

Il est intéressant de rapprocher l'action du formol sur les antigènes de la transformation des alcaloïdes en génalcaloïdes (Polonovski); le caractère toxique de ces substances peut être considérablement diminué par une simple transformation chimique, alors que leurs propriétés pharmacodynamiques sont entièrement conservées.

de divers sérums thérapeutiques destinés aux armées exigeaient l'addition à ces sérums d'un antiseptique, car les conditions matérielles de réalisation de ces différentes opérations étaient souvent défectueuses, et de nombreux accidents infectieux avaient été signalés. Ramon, à la suite de plusieurs essais, proposa le formol. Ajouté, à dose minime, au sérum sanguin (1 cm³ de la solution d'aldéhyde formique pour 2 à 3 litres de sérum), ce produit ne modifie ni l'aspect physique du sérum, qui devient plus limpide et plus brillant, ni surtout ses propriétés spécifiques antitoxiques et agglutinantes. Le sérum ainsi formolé est parfaitement inoffensif. Toutes ses propriétés se conservent si l'on associe à l'action du formol un chauffage d'une heure à 55° C. Ces recherches, pour des motifs évidents, ne furent pas publiées à l'époque (*). On sait quel rôle l'addition à la toxine de formol, à l'origine employé comme antiseptique, joue dans la mise en évidence, en 1923, du principe des anatoxines.

Les travaux ultérieurs ont eu un but beaucoup plus théorique : le formol bloquant les fonctions aminées des protéines, on a voulu évaluer l'importance de ces fonctions dans les propriétés anticorps. Nicolas et Panisset [650] ont montré que le formol n'altérait pas les anticorps d'un sérum hémolytique, même si les doses employées amenaient une gélification. C'est qu'en réalité le formol modifie peut-être aussi la résistance des hématies à l'hémolyse. Forsmann [271], deux ans plus tard, montrait, au contraire, la grande sensibilité du complément et des hémolysines à l'aldéhyde formique. Ces travaux furent repris par Baivy qui fit l'étude de différents anticorps [39] : les précipitines perdent complètement leur activité avec des doses de formol faibles, 1 p. 1.000 seulement, parfois; la formolisation du

(*) Consulter à ce sujet [770]. Cette action stabilisatrice du formol, à faible dose, a encore été employée récemment par Ramon pour la conservation des solutions d'antitoxine tétanique [768], des principes antidotiques de filtrats de culture de *B. subtilis*, de *Penicillium notatum* et de pénicilline commerciale [776-778].

sérum précipitable, au contraire, n'est entravée qu'avec de fortes doses d'aldéhyde. Les agglutinines microbiennes, rapidement détruites à 56° C., le sont lentement à la température ordinaire; les hémoagglutinines sont encore plus sensibles. Des sérums de syphilitiques donnent des réactions négatives après formolisation. La sensibilité des précipitines fut confirmée par Glenny [301]. Dujarric de la Rivière a rappelé récemment [208] les propriétés des *formosérums* qu'il avait mises en évidence en 1929 [212] : l'addition de petites doses de formol à un immunsérum empêche, dans certaines conditions, toute floculation. Braun [98] a montré que le formol inhibe les réactions de fixation du complément, d'agglutination et de précipitation. Mudd et Joffe [625] obtiennent des résultats analogues avec les agglutinines. Horsfall [422] a étudié l'inhibition des réactions de précipitation spécifique par le formol : elle a lieu lorsque l'anticorps a été suscité chez l'animal au moyen d'une protéine formolée, mais fait défaut avec un anticorps provoqué par injection de protéines natives.

Chow et Gœbel [147], travaillant sur la précipitine antipneumococcique, notent, après traitement par le formol, une perte presque complète de son activité floculante; cette perte est d'ailleurs réversible, et l'activité initiale peut être rendue par un traitement convenable. Les diverses précipitines, examinées par Iwanoff [436], sont également très sensibles à l'action du formol.

Eagle a été conduit à s'intéresser à l'effet du formol sur les anticorps floculants [224], à la suite de travaux analogues effectués en couplant des azoïques aux précipitines [225] : les anticorps ainsi traités se combinaient encore à l'antigène, sans donner lieu à l'apparition de flocons visibles. Avec le formol, Eagle obtient des résultats analogues : quand la concentration augmente, la floculation devient de plus en plus lente à apparaître. Le même antisérum formolé ne subit, au contraire, que peu de modifications de ses propriétés antigéniques. Pour Eagle, les groupements

aminés des anticorps ne jouent pas un rôle important dans la formation de la combinaison spécifique. L'auteur interprète l'inhibition de la précipitation selon la théorie de Bordet (voir p. 108). Heidelberger, Grabar et Treffers [362], la même année, opérant avec des produits analogues, montrent que les résultats d'Eagle, et les leurs, confirment, au contraire, la théorie de la multivalence mutuelle. Un travail récent de Pons [726], dans le cas particulier du sérum antitétanique, interprète le retard à la floculation due au formol, par une diminution de l'avidité de l'antisérum.

Il semble donc, à la lumière de tous ces travaux, que les anticorps soient beaucoup plus sensibles que les antigènes à l'action du formol; s'ils gardent le pouvoir de s'unir à l'antigène, les manifestations de la seconde phase de la réaction antigène-anticorps semblent ne plus se produire dès que la concentration en aldéhyde atteint un niveau d'ailleurs peu élevé. Notons que d'autres susbstances, des hormones, comme l'insuline [42, 443], l'hormone ocytocique [48] ou parathyroïdienne [930], certains antibiotiques (*) et certains enzymes [769] perdent également une partie de leurs propriétés physiologiques par formolisation.

Il est cependant difficile de comparer entre elles les expériences effectuées sur les antigènes et sur les anticorps, car les conditions de traitement ont souvent été différentes. Il y a, d'autre part, une différence de constitution chimique très importante entre la toxine diphtérique, par exemple, et l'antitoxine homologue.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'effectuer une série d'expériences où l'antigène et l'anticorps seraient soumis à l'action de mêmes quantités de formol, dans les mêmes conditions de temps et de température.

Ce sont ces recherches que nous allons maintenant relater.

(*) La gramicidine en particulier [577, 274].

II. — TRAVAUX PERSONNELS

ACTION COMPARÉE DU FORMOL SUR L'ANTIGÈNE ET SUR L'ANTICORPS D'UN MÊME SYSTÈME PRÉCIPITANT.

Nous avons voulu réaliser quelques essais dans un système précipitant où les deux agents présentent entre eux certaines analogies de constitution chimique. C'est pourquoi nous nous sommes adressé au couple sérum de Cheval-antisérum de Lapin, couple dans lequel l'antigène et l'anticorps sont constitués tous deux par des protéines sériques.

Nous ne reviendrons pas sur les techniques employées pour l'obtention des divers sérums ni sur la description des méthodes d'évaluation de leur activité; il suffira de se reporter aux chapitres précédents.

Nous avons tout d'abord, à l'aide d'une technique pondérale (*), dosé la teneur des deux sérums, antigène et anticorps, en protéines; puis nous avons dilué, avec de l'eau physiologique, le sérum le plus riche, de manière à égaliser exactement les concentrations en protéines de l'antigène et de l'anticorps.

Chaque sérum a été alors soumis à l'action d'un même volume de solution de formol préalablement ramenée à *p*H 7 (**). Nos expériences se répartissent en deux séries :

a) Dans la première, nous avons observé l'influence de la formolisation de l'antigène et de l'anticorps dans la zone d'équivalence;

b) Dans la deuxième, nous avons profité des résultats obtenus précédemment pour examiner le comportement des

(*) Décrite dans la thèse de Tayeau [895], à laquelle nous renvoyons le lecteur.

(**) Le *p*H joue un rôle important dans ces réactions (Tayeau et Pautrizel [901]).

anticorps et des antigènes formolés lorsqu'ils sont mélangés en proportions variables.

A. — Etude de la zone d'équivalence (*)

Avec les sérums de Cheval et de Lapin, natifs ou formolés, nous avons réalisé les mélanges suivants :

L N-C F : Sérum de Lapin normal-sérum de Cheval formolé;

L F-C N : Sérum de Lapin formolé-sérum de Cheval normal;

L F-C F : Sérum de Lapin formolé-sérum de Cheval formolé,

de telle sorte que les concentrations respectives des deux sérums correspondent à la zone d'équivalence que nous avions, bien entendu, déterminée au préalable avec les sérums non traités, à l'aide de la méthode de Dean et Webb. Dans différentes expériences, nous avons fait varier la concentration de la solution de formol, la température de contact du sérum avec cette solution et, enfin, le temps de contact lui-même. Nous avons noté le temps de floculation des mélanges L N-C F, L F-C N et L F-C F; nous avons comparé les chiffres obtenus avec celui correspondant au temps de floculation T de l'antigène et de l'anticorps originels, mélangés dans les proportions optima.

Nous avons effectué de nombreuses expériences avec des sérums de titre et d'activité variables : nos résultats ont toujours été comparables et peuvent se résumer par les essais suivants :

Expérience I

Sérum du Lapin 71; temps de contact : 1 minute, pour un mélange de sérum de Lapin dilué au 1/8e et pour un sérum de Cheval dilué au 1/128e.

Les sérums antigène et anticorps sont traités chacun par un égal volume d'une solution formolée et neutralisée, plus

(*) [646].

ou moins concentrée, pendant un temps variable, à la température de 37° C.

Au moment d'effectuer la réaction de précipitation, chaque sérum (déjà dilué au 1/2 avec la solution formolée) est dilué avec de l'eau physiologique pour l'amener à la concentration de 1/8e pour l'anticorps et de 1/128e pour l'antigène ; on mélange alors 1 cm³ de chaque dilution, on porte le tube au bain-marie à 37° C, après l'avoir agité par deux retournements, et l'on note le temps nécessaire à l'apparition de flocons visibles à l'œil nu.

Le tableau suivant condense nos résultats :

Lapin 71	TEMPS DE CONTACT A 37°											
Concentration de la solution de formol	5 minutes			1 heure			2 heures			19 heures		
	LNCF	LFCN	LFCF	LNCF	LFCN	LFCF	LNCF	LFCN	LFCF	LNCF	LFCN	LFCF
1/10.....	1	16	16	1 ½	L	L	3	L	L	»	»	»
1/100.....	1	2	2	1	70	100	1 ½	12 h.	18 h.	»	»	»
1/1000....	1	1	1	1	1 ¼	1 ¼	1	1 ½	2	1 ½	1 ¾	2 ¼
1/10000...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 ¼	1 ½

L, Louche après 18 heures.

Cette expérience peut susciter quelques objections : si l'action du formol est réversible [147, 362], le produit essayé contiendra d'autant moins de formaldéhyde fixé aux protéines (*) qu'il aura été plus dilué : 1 cm³ d'antigène, par exemple, dilué au 1/128e, contiendra moins de formol que l'anticorps dilué seulement au 1/8e. Ces différences suffisent, peut-être, à expliquer les temps de floculation différents observés.

(*) Pour une même quantité de protéines.

Expérience II

Sérum du Lapin 82; les proportions optima, pour les sérums non traités, sont obtenues en mélangeant 1 cm³ de sérum de Lapin dilué au 1/8e et 1 cm³ de sérum de Cheval dilué au 1/32e.

Ces proportions peuvent être obtenues également en mélangeant 1 cm³ de sérum anticorps au 1/8e et 0,25 cm³ de sérum antigène, lui-même dilué au 1/8e; dans ces conditions, T est alors de 2 minutes.

Les deux sérums sont donc traités, chacun, ici encore, par un volume égal de solution formolée neutralisée, de concentration variable, pendant un temps plus ou moins long, au bain-marie à 37° C.

Ce temps écoulé, les deux sérums sont dilués tous deux au 1/8e avec de l'eau physiologique, et l'on observe la précipitation en mélangeant 1 cm³ de sérum anticorps formolé et 0,25 cm³ de sérum antigène également traité.

Les résultats obtenus se trouvent consignés dans le tableau suivant :

Lapin 82	TEMPS DE CONTACT A 37°											
Concentration de la solution de formol	5 minutes			1 heure			2 heures			24 heures		
	LNCF	LFCN	LFCF	LNCF	LFCN	LFCF	LNCF	LFCN	LFCF	LNCF	LFCN	LFCF
1/10.....	2 ½	10	14	15	L	L	60	L	L	»	»	»
1/50.....	2	2 ½	2 ½	4	L	L	16	L	L	»	»	»
1/100.....	2	2	2	3	90	L	4	L	L	10	L	L
1/1000....	2	2	2	2	2	2	2	2 ½	2 ½	2	2 ½	3

L, Louche après 24 heures.

Expérience III

Sérum du Lapin 28. Les proportions optima correspondent, ici aussi, à 1 cm³ de sérum anticorps dilué au 1/8e et 1 cm³ de sérum antigène dilué au 1/32e. Pour les raisons exposées plus haut, nous avons préféré opérer avec 1 cm³ de sérum de Lapin au 1/8e et 0,25 cm³ de sérum de Cheval au 1/8e. T = 3 min. 1/2.

Nous avons utilisé, dans cette expérience, une solution de formol de concentration fixée à 1/100e, le temps de contact avec cet agent étant de 40 minutes. Nous avons étudié l'influence de la température à laquelle on fait agir le formol sur le sérum vis-à-vis du temps de floculation.

Température de contact	0°	10°	20°	30°	40°	50°
L N-C F	3 ¾	4	4 ½	5	5 ½	8
L F-C N	4	4 ½	11 ½	27 ½	82	4 h.
L F-C F	5	6	17	36	122	12 h.

Conclusions

Les expériences dont nous venons de relater quelques exemples nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

1° D'une manière générale, le formol apporte un retard à la floculation, mais ce retard varie considérablement selon que l'aldéhyde a agi sur l'antigène ou sur l'anticorps : sur l'antigène, le retard n'est sensible qu'à des concentrations en formol élevées et après un contact assez long; il est toujours minime. Au contraire, le retard à la floculation apporté par la formolisation de l'anticorps est toujours plus évident : pour des concentrations et des temps de contact importants, on arrive même à ne plus observer de flocons visibles à l'œil nu, mais seulement une opalescence plus ou moins marquée. Le temps de floculation du mélange L F-C F est toujours

un peu supérieur, mais de l'ordre de grandeur de celui du mélange L F-C N.

Notons qu'aux concentrations où l'on utilise habituellement le formol dans un but antiseptique (de 1/30.000e à 1/4.000e), les retards à la floculation observés sont très minimes, et la réactivité des antigènes ou des anticorps n'est donc pas pratiquement modifiée.

2° L'action du formol sur les protéines sériques n'est pas réversible, ou la réversibilité, si elle existe, n'est pas totale, ni rapide; dans l'expérience II et la suivante, les mélanges L N-C F et L F-C N présentent des temps de floculation très différents, alors que leur teneur globale en formol est la même.

3° Lorsque l'on fait varier de 0° à 50° la température de contact des sérums avec la solution formolée, la concentration et la durée de contact étant fixes, on a un accroissement du temps de floculation.

4° Les retards à la floculation sont d'autant plus accusés que les immunsérums sont moins avides.

L'anticorps est donc nettement plus sensible au formol que l'antigène : or, nous savons depuis Landsteiner que les groupements les plus actifs de l'antigène sont les fonctions acides; nous avons vu leur importance en étudiant les antigènes artificiels. Les groupements acides réagissent peu avec le formol qui se combine plus volontiers aux fonctions aminées basiques. Les groupements $-NH_2$ doivent donc jouer un rôle plus important dans l'activité spécifique de la molécule d'anticorps que dans celle de l'antigène (*). En somme, les fonctions formant le motif spécifique seraient surtout acides pour l'antigène, basiques pour l'anticorps. Notons cependant que le blocage par acétylation de 30 p. 100 des groupements aminés d'un immunsérum laisse intacte la

(*) Dans l'antitoxine diphtérique, les fonctions responsables de l'activité antitoxique ne jouent aucun rôle dans le pouvoir antigénique [223].

majeure partie de ses propriétés antitoxiques [309, 822, 823] (*).

Nos résultats nous permettent aussi de confirmer la complexité de la réaction formol-protéine, qui est lente et progressive : la durée de contact avec le formaldéhyde a une influence primordiale sur le temps de floculation, que la formolisation porte sur l'antigène ou sur l'anticorps. La méthylénisation rapide des groupes $-NH_2$ est donc suivie d'une dénaturation progressive de la molécule protéinique.

Le retard à la floculation que nous avons observé n'est-il pas dû à une perte d'unités floculantes de l'antigène ou de l'anticorps ? Autrement dit, le formol est-il susceptible de modifier les proportions optima de floculation ? Le retard apporté est-il du même ordre pour les mélanges en proportions variables d'antigène et d'anticorps ?

Les expériences suivantes répondent à ces questions.

B. — Influence des proportions variables d'antigène et d'anticorps (**)

Les résultats précédents nous permettent maintenant de préciser, pour un sérum d'une avidité donnée, les conditions de traitement par le formol telles que le retard à la floculation soit nettement marqué tout en n'étant pas exagérément prolongé. En effet, le formaldéhyde, à des concentrations peu importantes, agissant pendant un temps relativement court, ne modifie guère la vitesse de floculation. Au contraire, quand la précipitation est très retardée, l'apparition de flocons se fait de manière très progressive, et il est assez difficile de noter avec exactitude le moment correspondant à l'insolubilisation réelle du complexe antigène-anticorps.

(*) Il est également possible que l'anticorps, dont la structure spécifique est acquise, soit plus sensible à la dénaturation que l'antigène, dont les caractères immunologiques sont plus fondamentaux : nous avons vu que l'anticorps était également plus sensible que l'antigène à l'étalement en lame mince.

(**) [647].

Nous avons traité, dans les mêmes conditions de concentration en formol, de temps et de température de contact, les sérums antigène et anticorps, toujours ramenés à la même concentration protéidique.

Nous avons noté ensuite les temps de floculation des différents mélanges obtenus en ajoutant à un même volume d'immunsérum de Lapin un égal volume d'une dilution croissante de sérum de Cheval (α titration), et ceci dans les quatre séries L N-C N (témoin), L N-C F, L F-C N et L F-C F.

Expérience I

Sérum de Lapin 72.

La première série L N-C N, série témoin, s'obtient en mélangeant 1 cm³ de sérum de Lapin dilué au 1/8e avec de l'eau physiologique et 1 cm³ d'une dilution de sérum de Cheval établie ainsi :

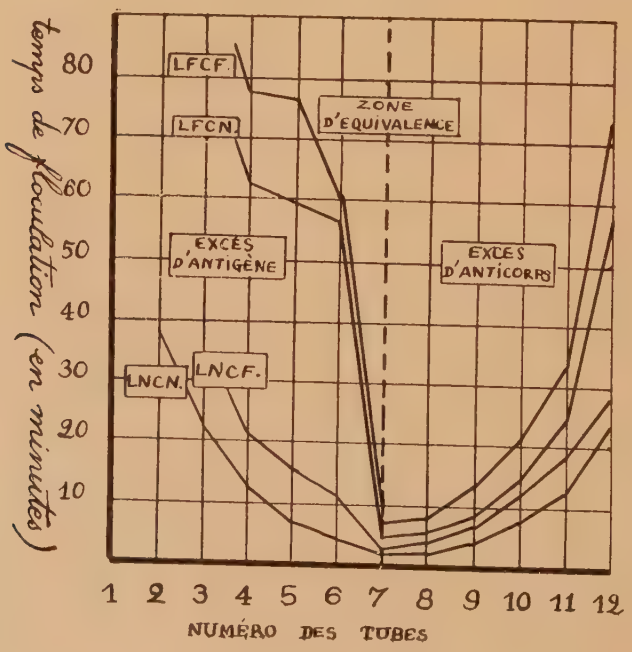
N° du tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	etc...
Dilution.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	etc...

Aussitôt le mélange réalisé, on agite et on porte le tube au bain-marie à 37° C.; on note avec soin le début de la floculation. Pour les autres séries, on utilise des sérums formolés préparés de la manière suivante : un volume de sérum (antigène ou anticorps) est soumis à l'action d'un volume égal d'une solution formolée à 1 p. 200, pendant un heure, au bain-marie; ce temps écoulé, on amène les deux agents aux mêmes concentrations que celles employées dans la série témoin, par une dilution convenable avec de l'eau isotonique.

Les temps de floculation (en minutes) que nous avons mesurés sont les suivants :

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lapin 1/8, cm³..	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cheval 1 cm³, dilution.....	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
L N-C N.....	»	37 ½	22 ½	12 ½	8	6 ¼	**1**	2 ¼	4 ½	8 ½	13 ½	25
L N-C F.....	»	»	»	22 ½	15 ½	11	**1** ½	4	7 ½	22 ½	19	28
L F-C N.....	»	»	»	62 ½	60	57 ½	**6**	7	8	14 ½	26	57 ½
L F-C F.....	»	»	»	79	77	60	**7**	8	11 ½	21	36	73

Ces résultats sont plus frappants encore sur un graphique.



Expérience II

Sérum du Lapin 83, moins avide que le précédent.

Le protocole expérimental est le même que dans l'expérience I.

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Lapin 1/8, cm³.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cheval 1 cm³, dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
L N-C N.....	»	»	25	8	**4**	7	9	14	15	17	19
L N-C F.....	»	»	45	12	**6**	**9**	13	14	15	17	18
L F-C N.....	»	»	»	35	**15**	17	19	23	28	30	32
L F-C F.....	»	»	»	40	**19**	23	27	29	31	34	35

Ces expériences nous permettent de faire plusieurs constatations :

1° Pour les différentes proportions relatives d'antigène et d'anticorps, les temps de floculation sont variables dans les quatre séries; ils se rangent dans l'ordre suivant :

L N-C N < L N-C F < L F-C N < L F-C F.

Les temps de floculation de la série L N-C F sont toujours très voisins de ceux de la série témoin; ceux des séries L F-C N et L F-C F sont notablement plus élevés. On peut donc généraliser, à toute la gamme des proportions variables d'antigène et d'anticorps, les résultats obtenus dans notre premier groupe d'expériences.

2° Il est remarquable de constater que, dans les quatre séries, ce sont les mêmes proportions relatives d'antigène et d'anticorps qui fournissent la zone d'équivalence, région pour laquelle le temps de floculation est minimum. Le formol ne change donc pas l'allure générale de la réaction antigène-anticorps. Il ne détruit pas un certain nombre

d'unités floculantes, mais agit simplement en freinant la vitesse de précipitation.

3° L'examen des résultats que nous avons obtenus, et en particulier de la courbe qui illustre la première expérience, nous montre un fait assez inattendu : le retard à la floculation, apporté par la formolisation de l'antigène, présente approximativement la même valeur dans les différents tubes. La courbe représentant la série L N-C F, comme d'ailleurs celle du témoin L N-C N, est grossièrement symétrique par rapport à la zone d'équivalence. Il n'en est pas de même, au contraire, des courbes L F-C N et L F-C F; l'action du formol sur l'anticorps produit un retard à la précipitation qui est surtout manifeste dans la région d'excès d'antigène : dans cette zone, les deux courbes ont une pente très accusée. Pour les proportions optima et dans la région d'excès d'anticorps, l'allure générale des quatres courbes est très voisine.

Ces résultats trouvent une application pratique : lorsqu'on veut évaluer le titre d'un immunsérum par la méthode de Dean et Webb, on est parfois gêné pour déterminer avec précision les proportions optima : il arrive souvent, surtout lorsque les sérums sont très avides, que plusieurs tubes voisins de la zone d'équivalence présentent des temps de floculation égaux ou très rapprochés. Dans ces conditions, il est difficile de désigner le tube correspondant à la floculation la plus rapide.

Si l'on opère, au contraire, non plus avec l'immunsérum originel, mais avec le même sérum formolé, le temps de floculation du premier tube de la région d'excès d'antigène sera beaucoup plus important que celui de son voisin de droite, correspondant aux proportions optima. Si l'on représente graphiquement les résultats, la brisure de la courbe indiquera nettement le mélange correspondant à la stricte équivalence (*). L'expérience suivante nous fournit un bon

(*) Cette pratique est aussi particulièrement commode lorsqu'on doit effectuer le titrage de plusieurs immunsérums et que l'on est seul pour noter les différentes valeurs des temps de floculation.

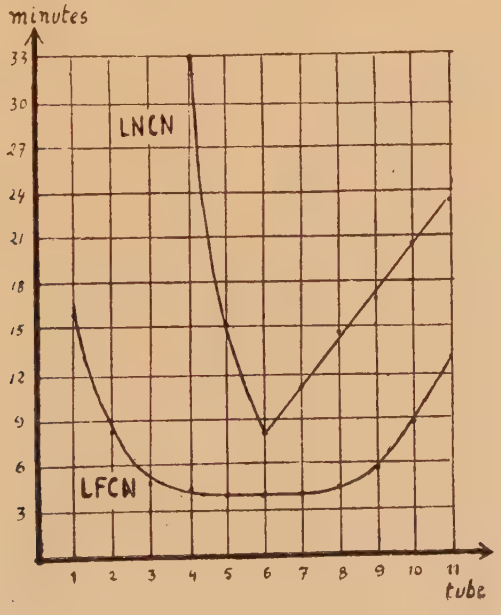
exemple : pour déterminer avec précision le titre de l'immunsérum, nous avons effectué une dilution de l'antigène beaucoup plus progressive que dans les essais précédents.

Expérience

Sérum du Lapin 78.

Sérum anticorps traité par un égal volume d'une solution de formol à 1 p. 200, à 39° C., pendant une heure.

TUBES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Lapin 1/8, cm³.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cheval 1 cm³, dilution.	1/40	1/53	1/71	1/94	1/126	1/168	1/224	1/299	1/400	1/533	1/710
L N-C N.....	16	8	5 ¾	4 ¾	4	4	4	4 ¾	5 ¾	8 ¾	12 ¾
L F-C F.....	»	»	»	33	15	8	12	14 ½	16 ½	19 ¼	23



Interprétation

On pourrait penser que le retard à la floculation observé est dû à une solubilité plus grande du complexe antigène-anticorps. Il faudrait, pour cela, que les protéines formolées soient plus solubles. C'est l'opinion d'Eagle [224] : cet auteur constate qu'avec le sérum antipneumococcique qu'il emploie, une partie importante des anticorps précipite par simple dilution avec de l'eau distillée. Ce phénomène ne se produit pas avec le même sérum soumis à l'action du formol. Cette plus grande solubilité de l'anticorps formolé ne pourrait expliquer les différences notables que nous observons dans les régions d'excès d'antigène ou d'anticorps. Les arguments proposés par Eagle sont d'ailleurs contestables : les sérums antipneumococciques de Lapin ne précipitent pas, d'ordinaire, par dilution aqueuse [362]. Pour de nombreux auteurs, les protéines formolées seraient, au contraire, moins solubles que les protéines natives [390, 597].

Il est certain que la première phase d'accolement de l'antigène à l'anticorps a lieu dans tous les cas : même lorsque la floculation ne se produit pas, on note une opalescence caractéristique. Nous avons vu qu'un sérum antidiphtérique formolé pouvait encore être doué de propriétés antitoxiques, alors qu'il ne flocule plus la toxine correspondante. Il semble donc que le formol perturbe surtout la deuxième phase de la réaction antigène-anticorps.

Nous pensons, avec Pons [727], que la formolisation entraîne surtout une diminution de l'avidité de l'antigène ou de l'anticorps. Le blocage des fonctions aminées (*) modifie la structure du motif spécifique. Dans les conditions où nous avons opéré, les modifications ne sont pas très importantes : les forces d'attraction spécifique entre anti-

(*) Accompagné des réactions de cyclisation et de condensation dont nous avons parlé plus haut.

gène et anticorps demeurent, mais sont plus faibles; les motifs remaniés s'accolent d'une manière moins étroite aux groupements déterminants opposés; la réaction s'effectue plus lentement, l'avidité réciproque est plus faible.

L'antigène, dont le motif contient peu de groupements influencés par le formol, aura, vis-à-vis de l'anticorps natif, une avidité très voisine, qu'il ait été formolé ou non. La vitesse de floculation de l'antigène formolé se rapprochera donc de celle de l'antigène non traité. L'anticorps subira une perturbation beaucoup plus importante de son motif spécifique, où les fonctions aminées sont nombreuses. Les anticorps formolés floculeront lentement.

L'allure des résultats que nous avons obtenus nous permet de confirmer les théories de Marrack ou d'Heidelberger; ces auteur admettent, rappelons le, que l'agrégation secondaire des complexes antigène-anticorps primitifs s'effectue par des forces spécifiques. D'après leurs conceptions, la molécule d'antigène, comme celle d'anticorps, serait hérissée d'un grand nombre de motifs spécifiques, chaque molécule pouvant ainsi fixer plusieurs molécules opposées (multivalence mutuelle). Dans la zone d'excès d'anticorps, un seul motif par molécule d'anticorps entre en réaction avec l'antigène; chaque molécule d'antigène se trouve alors entourée de plusieurs molécules d'anticorps. Tous les motifs des molécules d'antigène entrent en combinaison, alors qu'au contraire la plupart des motifs des molécules d'anticorps sont libres. Comme le formol ne modifie pas beaucoup la structure de l'antigène, les temps de floculation observés avec le sérum de Cheval formolé ne seront que très peu augmentés.

Dans la région d'excès d'antigène, c'est le contraire qui se produit : les motifs dénaturés de chaque molécule d'anticorps formolé assureront l'attraction de plusieurs molécules d'antigène. Les forces d'attraction étant faibles, les réactions seront limitées et les temps de floculation très importants. C'est effectivement ce que l'on observe.

En somme, l'asymétrie de nos résultats par rapport à la région d'équivalence provient de ce que les motifs spécifiques des anticorps, sensibles au formol, interviennent dans la formation du précipité spécifique, davantage dans la zone d'excès d'antigène que dans la région d'excès d'anticorps (*).

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

a) Lorsqu'on traite par le formol, dans des conditions analogues, l'antigène ou l'anticorps du système sérum de Cheval-antisérum de Lapin, on obtient un retard à la floculation d'autant plus net que la solution d'aldéhyde employée était plus concentrée, le contact avec cet agent maintenu pendant plus longtemps à une température plus élevée. Toutes choses étant égales, l'antigène est beaucoup moins sensible que l'anticorps à la formolisation; les temps obtenus avec l'antigène formolé se rapprochent de ceux obtenus avec le sérum non traité; la vitesse de précipitation des anticorps soumis au formol est faible.

b) Le retard à la floculation, apporté par la formolisation de l'anticorps, est surtout important dans la zone d'excès d'antigène. Ce résultat nous a permis de proposer un artifice très simple pour déterminer plus facilement, et avec plus d'exactitude, l'optimum de floculation d'un immunsérum précipitant.

L'interprétation de nos résultats nous a conduit à confirmer indirectement les théories de multivalence mutuelle concernant le mécanisme de la deuxième phase des réactions de précipitation antigène-anticorps.

(*) Si notre interprétation est exacte, un traitement auquel l'antigène serait plus sensible que l'anticorps nous donnerait des résultats inverses.

RÉSUMÉ
ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I

Dans la première partie de notre travail, nous avons très rapidement exposé les notions fondamentales concernant les agents de la réaction de précipitation spécifique, les antigènes et les anticorps. L'étude des antigènes nous a permis de montrer le rôle de certaines fonctions chimiques dans le déterminisme de la spécificité immunologique : ces différentes fonctions forment, par leur agencement réciproque, un *motif* caractéristique de chaque antigène. Après avoir résumé nos connaissances actuelles sur la nature et la structure des anticorps, puis sur leur lieu de formation, nous avons passé en revue les différentes hypothèses qui tendent à expliquer la manière dont s'élabore, au cours de la genèse de l'immunglobuline, une surface étroitement adaptée au *motif* antigénique.

II

La deuxième partie de notre exposé est consacrée à la réaction de précipitation spécifique elle-même. Après un bref historique, nous avons étudié le mécanisme d'union de l'anticorps à l'antigène au cours du premier temps de la réaction : nature des forces entrant en jeu, analogies avec certains phénomènes physicochimiques, modifications du

milieu entraînées par le rapprochement des agents. Le deuxième temps de la réaction, qui n'existe d'ailleurs pas dans tous les cas, consiste en l'insolubilisation du complexe précédemment formé. La composition du précipité, aussi bien que sa vitesse d'apparition, dépendent d'un certain nombre de facteurs qui sont successivement analysés. Les différentes techniques d'étude de la réaction sont décrites. L'exposé critique des diverses théories proposées pour interpréter la précipitation antigène-anticorps, nous montre enfin que si l'unanimité semble être réalisée sur la nature de la première phase de la réaction, les auteurs sont, au contraire, partagés en ce qui concerne le rôle des forces d'attraction spécifique au cours de la floculation proprement dite des agrégats.

III

La troisième partie rassemble nos recherches expérimentales :

1° Nous avons cherché tout d'abord à localiser la fraction précipitante du sérum antidiphtérique de Cheval en isolant, par divers procédés, des euglobulines et des pseudoglobulines. Les résultats dépendent essentiellement de la technique employée. Les euglobulines du sérum antidiphtérique, obtenues par dialyse, sont dépourvues de toute précipitine. Celles isolées au moyen des sels neutres précipitent rapidement la toxine correspondante, mais ne contiennent qu'une faible quantité d'unités floculantes. Les pseudoglobulines, au contraire, floculent beaucoup plus difficilement, mais la précipitation correspond à un titre plus élevé. Les euglobulines, qui proviennent d'un sérum non immun, ne peuvent conférer aux pseudoglobulines d'un sérum antidiphtérique le pouvoir précipitant du sérum initial. Des différences analogues se retrouvent pour les propriétés agglutinantes vis-à-vis des hématies humaines. Nous avons

émis une hypothèse, basée sur la théorie du réseau de Marrack, pour expliquer les faits précédents.

2° Nous avons effectué toute une série d'expériences pour préciser le rôle des lipides dans la réaction de précipitation antigène-anticorps. Le sérum antidiphtérique, entièrement privé de ses lipides, ou un sérum qui ne conserve que 15 à 20 p. 100 de ses lipides initiaux, perd ses propriétés floculantes tout en conservant ses propriétés antitoxiques. Le cholestérol ne joue aucun rôle dans le pouvoir floculant qui est probablement dû aux phosphatides. Dans un système où les deux constituants contiennent des lipides (sérum de Cheval-antisérum de Lapin), la délipidation du sérum antigène amène un retard à la précipitation et un rétrécissement de la zone de floculation; la délipidation du sérum anticorps provoque soit un très grand rétrécissement, soit même la disparition de la zone de floculation. Suivant que l'on a affaire à un sérum très avide ou peu avide, la délipidation totale des deux sérums est nécessaire ou non, si l'on veut obtenir la supression complète de la floculation. Ici encore le cholestérol ne joue aucun rôle : ce sont les lipides des cénapses les plus solides qui modifient la solubilité du complexe antigène-anticorps et amènent ainsi la précipitation. Seule la méthode de Hardy et Gardiner permet à la fois de respecter intégralement l'édifice protéique et de délipider totalement un sérum. La technique à l'acétone-éther (Piettre) ne semble pas dénaturante, mais respecte une partie des lipides cénapsés. La technique au méthylal (Delsal), qui permet une délipidation totale, dénature légèrement les protéines qui, dans le cas du sérum antidiphtérique, ont perdu une partie de leur pouvoir antitoxique.

3° Nous avons enfin étudié comparativement l'action de l'aldéhyde formique sur l'antigène et sur l'anticorps dans la réaction sérum de Cheval-antisérum de Lapin.

L'antigène est beaucoup moins sensible que l'anticorps à la formolisation : la vitesse de floculation des anticorps

ainsi traités est faible. Le retard à la précipitation, apporté par la formolisation de l'anticorps, est surtout important dans la zone d'excès d'antigène. Ce résultat nous a permis de proposer un artifice très simple pour déterminer plus facilement et avec plus d'exactitude l'optimum de floculation d'un immunsérum précipitant. L'interprétation de nos résultats nous a conduit à confirmer indirectement les théories de multivalence mutuelle concernant le mécanisme de la deuxième phase des réactions de précipitation antigène-anticorps.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu : *Le Doyen*,
R. DUPÉRIÉ.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
L. CHELLE.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 20 Février 1948.
Le Recteur,
A. MARCHAUD.

BIBLIOGRAPHIE

En dehors des nombreux articles consacrés aux réactions de précipitation antigène-anticorps, le lecteur pourra consulter avec fruit les ouvrages et revues générales suivants, où il trouvera une bibliographie plus complète.

1. Bordet (J.). — Traité de l'Immunité, 1 vol., 1939. Masson et C^ie^, édit., Paris.
2. Boyd (W. C.). — Fundamentals of Immunology, 1 vol., 1943, Interscience Publ. Inc., New-York, N. Y.
3. Kabat (E. A.) et Mayer (M.). — Experimental Immunochemistry, 1 vol., 1947, C. C. Thomas Publ., Springfield, Ill.

3^bis^. Kraus (R.). — Bakterienpräcipitation und Bakterienpräcipitine. *In* Kolle (W.) et Wassermann (A. v.). *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, t. II, 2^e^ partie, pp. 1140-1194; 3^e^ édit., 1929, G. Fischer et U. E. Schwarzenberg, édit., Jena.

4. Landsteiner (K.). — The Specificity of Serological Reactions, 1 vol., 1945. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
5. Marrack (J. R.). — The Chemistry of Antigens and Antibodies, 1 vol., 1938. His Majesty's Stationnary Office, London.
6. Topley (W. W. C.) et Wibon (G. S.). — The principles of Bacteriology and Immunity, 1 vol., W. Wood & C°, Baltimore.
7. Velluz (L.). — Chimie et Immunité. Rapport au VI^e^ Congrès de Chimie biologique, Lyon, 1937.
8. Wells (H. G.). — The Chemical Aspects of Immunity, 1 vol., 1925, New-York.
9. Zinsser (H.), Enders (J. F.) et Fothergill (L. D.). — Immunity : Principles and applications in Medecine and Public Health, 1 vol., Mac Millan & C°, New-York.

*
**

10. Abderhalden (E.). — Uber die Konstitution von Proteinkörpern. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1925, **142**, 306-313.
11. Abderhalden (E.) et Schwab (E.). — Uber Verbindungen von Typus : Amino saüre (2,5 dioxopiperazin) und ihr Verhalten gegenüber Saüre, Alkali und Fermenten. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1932, **212**, 61.
12. Abderhalden (E.) et Brockmann (H.). — Beitrag zur Konstitutionsermittlung von Proteinen bzw. Polypeptiden. *Biochem. Zeitschr.*, 1930, **225**, 386-408.
13. Abramson (H. A.). — Mixed agglutination. *Nature*, 1935, **135**, 995.
14. Abribat (M.). — Nouvelle méthode de séparation et de fractionnement par essorage de mousses. *In* Sur les phénomènes de mouillabilité et les applications de ces phénomènes, 1 vol., 1942, Hermann et C^ie^, édit., Paris, pp. 123-156.
15. Abribat (M.). — Nouvelles bandes dans le spectre d'absorption ultra-violet de la gélatine. *C. R. Acad. Sc.*, 1942, **214**, 417-419.
16. Adair (G. S.) et Robinson (M. E.). — The analysis of the osmotic pressures of the serum proteins and the molecular weights of albumins and globulins. *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 1864-1889.
17. Adnot (A.). — Contribution à l'étude des protides du sérum. Thèse Doct. Méd., Strasbourg, 1931.
18. Alexander (J.). — Some intracellular aspects of life and disease. *Protoplasma*, 1931, **14**, 296-306.
19. Anderson (T. F.) et Stanley (W. M.). — A Study by means of the electron microscope of the reaction between tobacco mosaic virus and its antiserum. *Journ. of Biol. Chem.*, 1941, 1939, 339-344.
20. Ando (K.), Kee (R.) et Manako (K.). — Studies on serum fractions. — I : Differences in the antigenic structure of different horse sera. *Journ. of Immunol.*, 1937, **32**, 83-96.
21. Ando (K.), Kee (R.) et Tomiyama (T.). — Studies on serum fractions. — II : Antisera prepared by immunizing rabbits with specific precipitates of pneumococci S. S. S. and with flocculi of diphteria toxoïd-antitoxin. *Journ. of Immunol.*, 1937, **32**, 181-194.
22. Anson (M. L.). — The Denaturation of Proteins. *In* Schmidt (C. L.) [842].
23. Anson (M. L.). — Protein Denaturation and the properties of Protein Groups. *Adv. in Protein Chemistry*, 1945, **2**, 361-386.
24. Armand (Y.). — Spécificité sérologique et constitution chimique de quelques antigènes, 1 vol., 1939. Hermann et C^ie^, édit., Paris.

25. Armangué (M.) et Gonzalès (P.). — Studies on the formol and Wassermann Reaction. *Journ. of Inf. Diseases*, 1922, **30**, 443-444.

26. Aronson (H.). — Experimentelle Untersuchungen über Diphterie und die immunseren Substanz des Blutserums. *Berlin. Klin. Wochenschr.*, 1893, **30**, 625-629.
— Weitere Untersuchungen über Diphterie und der Diphterie antitoxin. *Ibid.*, 1894, 453-456.

27. Arrhenius (S.). — Immuno Chemistry. 1 vol., 1907, Mac Millan et Cie, édit., New-York.

28. Arrhenius (S.) et Madsen (Th.). — Anwendung der physikalischen Chemie auf das Studium der Toxine und Antitoxine. *Zeitschr. f. Physik. Chem.*, 1903, **44**, 6-62.

29. Arthus (M.). — Les anatoxines *(premier mémoire)*. Destruction de la toxicité des venins par le formol. *Journ. Physiol. Path. Gén.*, 1930, **28**, 529-543.

30. Ascoli (M.) et Valenti (E.). Biologische Milzbranddiagnose. *Zeitschr. f. Hyg. u. infektionkr.*, 1910, **7**, 5-6.

31. Ascoli (M.). — Die Spezifische Meiostagmin reaktion (Eine physikalisch-chemische Immunitätsreaktion). *Münch. Med. Wochenschr.*, 1910, **57**, 62-63.

32. Atsbury (W. T.). — Cité par Marrack [5], p. 150.

33. Atsbury (W. T.) et Bell (F. O.). — Nature of the intramolecular fold in alpha-keratin and alpha-myosin. *Nature*, 1941, **147**, 696-699.

34. Avery (O. T.) et Gœbel (W. F.). — Chemo-immunological studies on the soluble specific substance of pneumoccocus. I : The isolation and properties of the acetyl-polysaccharide of pneumococcus type I. *Journ. of Exptl. Med.*, 1933, **58**, 731-755.

35. Avery (O. T.) et Tillet (W. S.). — Anaphylaxis with the type specific carbohydrates of pneumococcus. *Jounr. of Exptl. Med.*, 1929, **49**, 251-266.

36. Bach. — *Arch. Sc. Phys. et Nat.*, 1897, **3**, 88.

37. Bachmann (W.). — Serologische Studien mit Hilfe des Zeissschen Flüssigkeitinterferometers. II Mitteilung. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1923, **35**, 462-482.

38. Bagdasarian (G.). — Sur les différences entre les fractions protéiques provoquant le phénomène de précipitation annulaire et les fractions antitoxiques du sérum. *Arch. Roum. Path. Exp.*, 1942, **12**, 539-547.

39. Baivy (A.). — Action du formol sur les anticorps. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 737-739.

40. Banzhaf (E. J.), Sugiura (K.) et Falk (K. G.). — Studies on antibodies. I. Analysis and nitrogen distribution of a serie of antisera. *Coll. Stud. Bur. Lab. Dep. Health*, N. Y., 1916, **8**, 213-221.

41. Barr (M.), Glenny (A. T.) et Pope (C. G.). — Some observations on the distribution of antitoxins in serum. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1931, **12**, 217-226.

42. Barral (Ph.). — L'aninsuline. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 993-995.

43. Basset (J.), Machebœuf (M. A.) et Pérez (J. J.). — Etudes biologiques sur les effets des ultra-pressions : modifications de la spécificité antigénique des sérums sous l'influence des pressions très élevées. *C. R. Acad. Sc.*, 1935, **200**, 496-498.

44. Baudouy (C. T.). — Sur deux modes possibles de fixation du formol par certaines scléroprotéines. *C. R. Acad. Sc.*, 1942, **214**, 692-695.

— La fixation du formol par les scléroprotéines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 251-255.

45. Bayne-Jones (S.). — The titration of diphteria toxin and antitoxin by Ramon's floculation method. *Journ. of Immunol.*, 1924, **9**, 481-504.

46. Bayne-Jones (S.). — The heat produced by reaction of antigens with antibodies. *Journ. of Immunol.*, 1925, **10**, 663-676.

47. Beard (J. W.), Beard (D.) et Finkelstein (H.). — Human vaccination against equine encephalomyelitis virus with formolized chick embryo vaccine. *Science*, 1939, **90**, 215-216.

48. Beauvillain (A.). — Action du formol à + 5° C et à + 38° C sur l'hormone ocytocique post-hypophysaire. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 87-88.

49. Bechhold (H.). — Die Ausflockung von Suspensionen bzw. Kolloiden und die Bakterienagglutination. *Zeitschr. f. Physik. Chem.*, 1904, **48**, 384-423.

50. Behring (E. V.) — Die Geschichte der Diphterie. Mit besonderer Berücksichtigung der Immunitätslehre. 1 vol., 1913, G. Thieme, édit., Leipzig.

51. Belfanti (S.). — Les lipoïdes dans l'hémolyse. *C. R. I^er Congrès Intern. de Microbiol.*, Paris, 1930, t. II, pp. 3-21, Masson, édit.

52. Benedicenti (A.). — Beiträge zur Kenntniss der chemischen und physiologischen Wirkungen des Formaldehydes. Erste Mitteilung. Ueber die Einwirkung des Formaldehydes auf einige Proteïnstoffe. *Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.*, 1897, pp. 219-257.

53. Bereblum (I.) et Wormall (A.). — The immunological properties of proteins treated with $\beta\beta'$ dichloro-diethylsulphide (mustard gas) and $\beta\beta'$ dichloro-diethylsulphone. *Bioch. Journ.*, 1939, **33**, 75-80.

54. Berger (E.) et Erlenmeyer (H.). — Stoffliche Beziehungen

zwischen Antigen und Antikörper. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1931, **113**, 79-89.

55. Berger (W. Z.). — Ueber die Hyperproteinämie nach Eiweissinjektionen. Ein experimenteller Beitrag zur Pathologie des Serumproteins und zur Proteinkörpertherapie. *Zeitschr. f. Ges. Exp. Med.*, 1922, **28**, 1-44.
56. Bergmann (M.). — Gesammelte Werke von Emil Fischer. Untersuchungen über Aminosaüren, Polypeptide und Proteine. 1 vol., 1929, J. Springer, édit., Berlin.
57. Bernal (J. D.). — Structure of proteins. *Nature*, 1939, **143**, 663-667.
58. Berthelot (A.) et Ramon (G.). — Sur les agents de transformation des toxines en anatoxines. *C. R. Acad. Sc.*, 1925, **180**, 340-342.
59. Besredka (A.). — Ueber Anaphylaxie. *In* Hand. d. Techn. u. Methodik. d. Immunitätsforsch. 1 vol., 1911, Jena, pp. 523-528.
60. Bessemans (A.). — Influence de la dilution sur le pouvoir formol-gélifiant des sérums. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **87**, 401-404.
61. Bessemans (A.) et Boeckel (L. Van). — Une modification expérimentale du pouvoir formol-gélifiant du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 958-960.
62. Bessemans (A.) et Leynen (E.). — La formol-gélification chez quelques sérums d'animaux. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **87**, 104-107.
63. Biedermann (W.). — Uber Wesen und Bedeutung der Protoplasmalipoïde. *Pflüg. Archiv.*, 1924, **202**, 223-258.
64. Bing (J.). — The formolgel reaction and other globulin reactions. *Acta Med. Scand.*, 1937, **91**, 336-356.
65. Biscoe (J.), Hercik (F.). et Wyckoff (R. W. G.). — The Size of antibodies. *Science*, 1936, **83**, 602-603.
66. Björneboe (M.). — The specific protein in rabbit antipneumococcus serum and its relation to the increase of serum protein during immunization. *Journ. of Immunol.*, 1939, **37**, 201-206.
67. Björneboe (M.). — Serumprotein und Antistoffprotein bei Immunisierung mit mehreren antigenen. *Zeitschr. f. Immunitäsf.*, 1941, **99**, 245-256.
68. Blum (F.). — Ueber eine neue Klasse von Verbindungen der Eiweisskörpen. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1896-1897, **22**, 127-131.
69. Blumenthal (D.). — A Immunological study of the reduction of disulfide groups in proteins. *Journ. of Biol. Chem.*, 1936, **113**, 433-437.
70. Bocquet (P.) et Vendrely (R.). — Influence du pH sur la

transformation du venin de Cobra en anavenin par l'aldéhyde formique. Préparation d'un anavenin solide. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 179-180.

71. Boivin (A.). — Les antigènes somatiques et flagellaires des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **61**, 426-478.
72. Boivin (A.). — Les antigènes *(antigènes protéidiques)*. Fascicule 913 (1943), du Centre de Perfectionnement technique. Maison de la Chimie, 28, rue Saint-Dominique, Paris (VII[e]).
73. Boivin (A.). — Biochimie des antigènes et plus spécialement des antigènes bactériens. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1947, **7**, 64-110.
74. Boivin (A.) et Delaunay (A.). — Récentes découvertes concernant le lieu de formation des anticorps et le mécanisme hormonal de leur mise en liberté. *La Presse Médicale*, 1946, n° 2, pp. 16-17.
75. Boivin (A.) et Delaunay (A.). — Phagocytose et infection, 1947. 1 vol., Hermann et C[ie] édit., Paris.
76. Boivin (A.), Delaunay (A.) et Sarciron (R.). — Sur la détoxification par le formol des antigènes glucido-lipidiques (endotoxines) des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **134**, 1142-1145.
77. Boivin (A.), Mesrobeanu (I.) et Mesrobeanu (L.). — Extraction d'un complexe toxique et antigénique à partir du bacille d'Aertrycke. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, 307-310.
78. Boivin (A.) et Mesrobeanu (L.). — Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. I : Considérations générales et exposé des techniques utilisées. *Rev. d'Immunol.*, 1935, **1**, 559-569.
79. Bonot (A.). — Etude physico-chimique de la réaction des précipitines. Cas de la sérum-albumine iodée. Fraction non précipitable d'un système d'anticorps. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, **21**, 1417-1437.
80. Bordet (J.). — Le mécanisme de l'agglutination. *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, **13**, 225-250.
81. Bordet (J.). — Agglutination et dissolution de globules rouges par le sérum. *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, **13**, 273-297.
82. Bordet (J.). — Les sérums hémolytiques. Leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, **14**, 257-296.
83. Bordet (J.). — Traité de l'Immunité, 1[re] édition, 1 vol., 1920, Masson. édit., Paris.
84. Bordet (P.). — Mécanisme de l'allergie non spécifique et du phénomène de Schwartzman-Sanarelli. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **117**, 836-837.
85. Boulanger (P.). — Données biochimiques récentes sur la structure des protéines. *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1942, **3**, 82-112.

86. Boyd (W. C.). — Influence of antibody upon velocity of flocculation. *Journ. of Exptl. Med.*, 1941, **74**, 369-386.

87. Boyd (W. C.). — On the mechanims of specific precipitation. *Journ. of. Exptl. Med.*, 1942, **75**, 407-419.

88. Boyd (W. C.) et Bernard (H.). — Quantitatives changes in antibodies and globulin fractions in sera of rabbits injected with several antigens. *Journ. of Immunol.*, 1937, **33**, 111-122.

89. Boyd (W. C.), Conn (J. B.), Gregg (D. C.), Kistiakowsky (G. B.) et Roberts (R. M.). — The heat of serological reactions. *Science*, 1940, **92**, 604-605.

— The heat of antibody-antigen reaction. *Journ. of Biol. Chem.*, 1941, **139**, 787-794.

90. Boyd (W. C.) et Hooker (S. B.). — The influence of the molecularweight of antigen on the proportion of antibody to antigen in precipitates. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1934, **17**, 341-348.

91. Boyd (W. C.) et Hooker (S. B.). — The influence of the molecular weight of antigen on the proportion of antibody to antigen in precipitates. II : a statistical examination of available data, including some previously unpublished. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1939, **22**, 281-292.

92. Boyd (W. C.) et Hooker (S. B.). — Specific molecular valency of antigen and antibody. *Rept. Proc. 3rd Intern. Congr. Microbiol.*, 1939, pp. 814-817.

93. Boyd (W. C.) et Malkiel (S.). — Crystalline horse hemoglobin as an antigen. *Journ. Bact.*, 1940, **39**, 32.

94. Boyd (W. C.) et Purnell (M. A.). — The essential difference between the two optimum proportions flocculation ratios. *Journ. of Exptl. Med.*, 1944, **80**, 289-298.

95. Boyd (W. C.) et Tamura (J. T.). — Anaphylactic shock prevented by ketenizing serum. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1938, **38**, 184-187.

— Influence of ketene on the potency of antipneumococcus serum. *Ibid.*, 1938, **38**, 909-911.

96. Brandrup (W.). — Saponins as emulsifiers in practical pharmacy. *Pharm. Zentralhalle*, 1934, **28**, 1844; d'après *Chemical Abstr.*, 1934, **28**, 2844[2].

97. Braun (R.). — Der Einfluss primärer Giftwirkung der Linsensubstanz auf das anaphylaktische Experiment mit Linseneiweiss. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1932, **75**, 326-336.

98. Braun (H.). — Ueber die Wirkung des Formaldehydes auf verschiedenartige Antikörperfunktionen. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1933, **78**, 46-61.

99. Breinl (F.) et Haurowitz (F.). — Chemische Untersuchung des Präzipitates aus Hämoglobin und anti-Hämoglobin-

serum und Bemerkung über die Natur der Antikörper. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1930, **192**, 45-57.

100. Breinl (F.) et Haurowitz (F.). — Aenderungen der Spezifizität von Immunseren nach chemischer Vorbehandlung. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1932, **77**, 176-186.

101. Bressler (S. E.) et Talmud (D. L.). — On the nature of the Globular Proteins. I. *C. R. Acad. Sc. U. R. S. S.*, 1944, **43**, 310-314.

102. Bressler (S. E.) et Talmud (D. L.) — On the nature of Globular Proteins. II : a few consequences of the new hypothesis. *C. R. Acad. U. R. S. S.*, 1944, **43**, 349-350.

103. Breton (A.). — Influence du vieillissement sur les sérums soumis à la réaction de Vernes à la résorcine. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 1429-1431.

103bis. Brocq-Rousseau (D.) et Roussel (G.). — Le sérum normal. *Deuxième série.* Propriétés physiologiques. 1 vol., 1939. Masson et Cie édit., Paris.

104. Brown (A. M.). — Optimal precipitation reactions. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1935, **16**, 554-566.

105. Brown (R.). — Rhythmic precipitation of pneumococcal soluble specific substances and antipneumococcal sera. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1940, **45**, 93-95.

106. Brunius. — Chemical studies on the true Forssmann hapten. 1 vol., 1936. Fahlerantz, édit., Stockholm.

107. Bruynoghe (R.). — L'identification du sérum chauffé. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 384-386.

— Le précipitogène des sérums chauffés. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 386-388.

— L'antigène des sérums chauffés. *Arch. Intern. Méd. Exp.*, 1924, **1**, 373.

108. Bruynoghe (R.) et Baivy (A.). — Le sérum formolé. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 381-384.

109. Buchner (H.). — Ueber die bakterientödtende Wirkung des Zellenfreien Blutserums. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1889, **5**, 817-823; *Ibid*, 1889, **6**, 1-11; Ueber die nähere Natur der Bakterientödtenden Substanz im Blutserum. *Ibid*, 1889, **6**, 561-565.

110. Bukantz (S. C.) et Gara (P. F. de). — Detectability of pneumococcal capsular polysaccharide and antibody in blood and saline solution (optimal concentration of antigen and antibody). *Journ. of Immunol.*, 1940, **39**, 195-205.

111. Burchard. — Diss. Rostock. *D'après* Tayeau [895].

112. Burke (V.). — A Comparison of the formaldehyd-gel reaction of Gate and Papacostas with the Wassermann reaction. *Arch. Derm. Syph.*, 1922, **5**, 469-477.

113. Burkhardt (A. E.). — Beiträge zur Chemie und Physiologie des Blutserums. *Arch. f. Exp. Path.*, 1883, **16**, 322.

114. Calmette (A.) et Massol (L.). — Les précipitines du sérum antivenimeux vis-à-vis du venin de Cobra. *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, **23**, 155-165.

115. Calvery (H. O.). — Analysis of type I pneumococcus specific precipitate. *Journ. of. Biol. Chem.*, 1935-1936, **112**, 167-169.

116. Calvery (H. O.), Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — Chemical analysis of type II pneumococcus specific precipitate. *Journ. of Biol. Chem.*, 1935, **109**, XV.

117. Camus (L.). — Spécificité et conditions d'action des précipitines. *C. R. Soc. Biol.*, 1902, **54**, 100-101.

118. Cannan (R. K.). — The Acid-Base titration of Proteins. *Chem. Reviews*, 1942, **30**, 395-412.

119. Cannan (R. K), Kibrick (A. C.) et Palmer (A. H.). — Amphoretic properties of egg-albumin. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1941, **41**, 243-266.

120. Cannan (R. K.), Palmer (A. H.) et Kibrick (A. C.). — The hydrogen ion dissociation curve of β-lactoglobulin. *Journ. of Biol, Chem.*, 1942, **142**, 803-822.

121. Cannon (P. R.). — Antibodies and the protein reserves. *Journ. of Immunol.*, 1942, **44**, 107-114.

— The relationship of protein metabolism to antibody production and resistance to infection. *Adv. in Prot. Chem.*, 1945, **2**, 135-154.

— The importance of proteins in resistance to infection. *Journ. of Amer. Med. Assoc.*, 1945, **128**, 360-362.

122. Cannon (P. R.), Chase (W. E.) et Wissler (R. W.). — The relationship of the protein reserves to antibody production. *Journ. of Immunol.*, 1943. **47**, 133-147.

123. Cannon (P. R.) et Marshall (C. E.). — An improved serologic Method for the determination of the precipitation titers of antisera. *Journ. of Immunol.*, 1940, **38**, 365-376.

124. Cantacuzène (J.). — Recherches sur l'origine des précipitines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1908, **22**, 59-65.

125. Carpenter (D. C.). — The Protein. Formaldehyde reaction. The question of Methylene Bridges and the unreactivity of Benzoyl d-d(-)-alanine toward formaldehyde. *Arch. of Biochem.*, 1946, **9**, 159-164.

126. Carrel (A.) et Ingebrigsten (R.). — The production of antibodies by tissues living outside of the organism. *Journ. of Exptl. Med.*, 1912, **15**, 287-291.

127. Caspersson (T.), Landström-Hyden (H.) et Aquilonius (L.). — Cytoplasmanukleotide in Eiweiss produzierenden Drüsenzellen, *Chromosoma*, 1941, **2**, 111-131,

128. Caspersson (T.) et Schultz (J.). — Risonucleic acids in both nucleus and cytoplasm, and the function of the nucleous. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, 1940, **26**, 507-515.

129. Caspersson (T.) Schultz (J.) et Aquilonius (L.). — The genetic control of nucleolar composition. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, 1940, **26**, 515-532.

130. Caspersson (T.) et Thorell (B.). — Der endozelluläre Eiweiss-und Nukleinsäurestoffwechsel in embryonalen Gewebe. *Chromosoma*, 1941, **2**, 132-154.

131. Caspersson (T.) et Thorell (B.). — *Acta Physiol. Scand.*, 1942, **4**, 97.

132. Castellani (A.). — Ueber das Verhältniss der Agglutinine zu den Schutzkörpern. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 1901, **37**, 381-392.

133. Césari (E.) et Bocquet (P.). — Sur le mécanisme de la détoxification du venin de *Vipera Aspis* par l'aldéhyde formique. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 19-23.

134. Chabrol (E.), Cottet (J.) et Cachin (M.). — Recherches sur le pouvoir cholestérolytique de la bile. Technique. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 726-728.

135. Chargaff (E.). — Lipoproteins. *Adv. in Prot. Chemistry*, 1944, **1**, 1-24.

136. Charonnat (R.). — Substances variées pouvant libérer le cholestérol de son support protéidique. *Journ. Pharm. Chim.*, 1936, 8e série, **23**, 307.

137. Charrin (A.) et Roger (G. H.). — Les propriétés microbicides du sérum. *Gazette hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie*, 1889, **26**, 818.

— Action du sérum des animaux malades ou vaccinés sur les microbes pathogènes. *C. R. Acad. Sc.*, 1889, **109**, 710-713.

138. Chase (M. W.) et Landsteiner (K.). — Immunochemistry. *Ann. Rev. of Biochemistry*, 1939, **8**, 579-610.

139. Chase (M. W.) et Landsteiner (K.). — Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds.

— X : Antibodies producing early skin reactions. *Journ. of Exptl. Med.*

— XII : Transfer of skin activity of the delayed type. *Ibid;* articles cités dans la notice nécrologique sur Landsteiner; voir p. 2, note.

140. Chassin (M. R.) et Bruger (M.). — The effect of induced hypercholesterolemia on antibody in rabbit. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1939, **42**, 457-459.

141. Chick (H.). — The apparent formation of euglobulin from pseudo-globulin and a suggestion as to the relationship between these two proteins in serum. *Biochem. Journ.*, 1914, **8**, 404-420.

142. Chick (H.) et Martin (C. J.). — On the « heat coagulation » of proteins. Part IV. The conditions controlling the agglutination of proteins already acted upon by hot water. *Journ. of Physiol.*, 1912, **45**, 261-295.

143. Chopra (R. N.) et Choudhury (S. G.). — On the causation of formogel reaction in Kala-Azar. Part I. *The Ind. Journ. of Med. Res.*, 1928-1929, **16**, 925-945.

144. Chopra (R. N.), Choudhury (S. G.) et De (N. N.). — Changes in the physical properties of Kala-Azar serum with treatment and its relation to the formogel-reaction. *The Ind. Journ. of Med. Res.*, 1931-1932, **19**, 423-430.

145. Chorine (V.). — L'instabilité du sérum dans l'eau distillée et les protéides sériques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **60**, 633-650.

146. Chow (B. F.). — The determination of plasma or serum albumin by means of a precipitin reaction. *Journ. of Biol. Chem.*, 1947, **167**, 757-763.

147. Chow (B. F.) et Gœbel (W. F.). — The purification of the antibodies in type I antipneumococcus serum, and the chemical nature of the type-specific reaction. *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **62**, 179-202.

148. Chow (B. F.), Lee (K. H.) et Wu (H.). — The Chemical nature of antibodies. *Chinese Journ. of Physiol.*, 1937, **11**, 175-182.

149. Chow (B. F.) et Wu (H.). — Isolation of immunologically pure antibody from immune precipitate of type I pneumococcus. *Chinese Journ. of Physiol.*, 1937, **11**, 139-152.

— Recovery of antibodies from immune agglutinates of type I pneumococcus. *Ibid*, 1937, **11**, 155-162.

150. Clutton (R. F.), Harington (C. R.) et Yuill (M. E.). — Studies in synthetic immunochemistry. II : Serological investigation of o.-β- Glucosidotyrosyl derivatives of proteins. *Biochem. Journ.*, 1938, **23**, 1111-1118.

151. Clutton (R. F.), Harington (C. R.) et Mead (T. H.). — Studies in synthetic immunochemistry. I : The synthesis of o.-β-Glucosidotyrosine and its introduction into the protein molecule. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 764-771.

152. Clutton (R. F.), Harington (C. R.) et Yuill (M. E.). — Studies in synthetic immunochemistry. III : Preparation and antigenic properties of thyroxyl derivatives of proteins, and physiological effects of their antisera. *Biochem. Journ.*, 1937, **32**, 1119-1132.

153. Cohn (E. J.). — The properties and function of the plasma proteins, with a consideration of the methods for their separation and purification. *Chem Reviews*, 1941, **28**, 395-417.

154. Cohn (E. J.). — U. S. Patent 2.390.740 (4-12-45).

155. Colwell (C. A.) et Youmans (G. P.). — The relation between constant-antiserum and constant-antigen optimal ratios obtained with rat and guinea-pig precipitin. *Journ. of Immunol.*, 1941, **42**, 79-89.

156. Condrea (P.) et Pœnaru (H.). — Recherches sur l'influence réciproque de deux couples floculants antigène-anticorps dans le même mélange. *Arch. Roum. Path. Exp.*, 1943-1944, **13**, 187-196.

157. Coulter (C. B.), Stone (F. M.) et Kabat (E. A.). — Structure of ultraviolet absorption spectra of certain proteins and aminoacids. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1935, **19**, 739-752.

158. Culberston (J. T.). — A quantitative Study of the precipitin reaction with special reference to crystalline egg albumin and its antibody. *Journ. of Immunol.*, 1932, **23**, 439.

159. Dakin (H. D.) et Dudley (H. W.). — The action of enzymes on racemized proteins, and their fate in animal body. *Journ. of Biol., Chem.*, 1913, **15**, 271-276.

160. Danielli (J. F.), Danielli (M.) et Marrack (J. R.). — Surface films of antibody and antigens. I : The effect of spreading on a water surface on the specific properties of pneumococcus (type I) antibody and Horse-serum globulin. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1938, **19**, 393-396.

161. Danysz (J.). — Contribution à l'étude des propriétés et de la nature des mélanges des toxines avec leurs antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1902, **16**, 331-345.

162. Danysz-Michel et Laskownicki (S.). — Variations du taux en cholestérine dans le sang sous l'action de certains antiseptiques et certains vaccins. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 632-634.

163. Dean (H. R.). — On the factors concerned in agglutination. *Proc. Roy. Soc.*, Ser. B, 1912, **84**, 416-434.

164. Dean (H. R.). — An attempt to preserve hœmolytic complement in a permanent form. *Journ. Path. Bact.*, 1913-1914, **18**, 118-119.

165. Dean (H. R.). — On the Mechanism of the serum reaction (Horace Doball Lecture). *Brit. Med. Journ.*, 1916, vol. II, 749-752.

166. Dean (H. R.). — Complement fixation in mixtures of Toxin and Antitoxin. *Journ. Path. Bact.*, 1927, **30**, 675-685.

167. Dean (H. R.) — The precipitation reaction. In *A System of Bacteriology*, t. 6, Londres, 1931, His Majesty's Stationnary Office; chap. XIII, pp. 424-451.

168. Dean (H. R.), Taylor (G. L.) et Adair (M. E.). — The precipitin reaction. Experiments with an antiserum containing two antibodies. *Journ. of Hyg.*, 1935, **35**, 69-74.

169. Dean (H. R.). — The reaction of isamine blue with serum. *Journ. Path. Bact.*, 1937, **45**, 745-771.

170. Deán (H. R.) et Webb (R. A.). — The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction. *Journ. Path. Bact.*, 1926, **29**, 473-492.

171. Dedjulin (A.). — Zur Rotzdiagnose. A. f. Vet. Wiss., 1889 (en russe) ; *Zur Diagnose bei Rotz. Bote f. öffentl. Veterinärnesen*, 1900 (en russe). Cité par Kraus [3bis].

172. Deicha (G.). — Epitaxie et approximation cristalline. *La Nature*, 1947, n° 3.143, pp. 279-282.

173. Delage (B.). — Liaisons lipides-protéides et vieillissement du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 1304-1310.

174. Delage (B.). — Sur le rôle que jouent les lipides dans certaines activités biologiques des sérums. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 1438-1448; *Arch. Inst. Pasteur du Maroc*, 1944, **3**, 1-19.

175. Delezenne (C.) et Fourneau (E.). — Constitution du phosphatide hémolysant (lysocithine) provenant de l'action du venin de Cobra sur le vitellus de l'œuf de Poule. *Bull. Soc. Chim. de France*, 1914, **15**, 421-434.

176. Delsal (J. L.). — Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal. Applications aux microdosages du cholestérol total, des phospho-aminolipides et des protéides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 99-105.

177. Demanche (R.). — La fonction antigénique des lipoïdes et les notions nouvelles sur le mécanisme des réactions sérologiques de la syphilis. *Presse Médicale*, 1931, n° 57, pp. 1077-1080.

178. Demanche (R.). — Précis de technique du sérodiagnostic de la syphilis. Réactions d'hémolyse. Réactions de floculation. 1 vol., 1944, 3e édition. G. Doin et Cie édit., Paris.

179. Demees (O.). — Précipitines et Précipitables. *Cellule*, 1907, **24**, 315-352.

180. Denis (P.). — Mémoire sur le sang. 1 vol., 1859. Baillière, édit., Paris.

181. Dervichian (D.). — Structure des protéines. *C. R. Acad. Sc.*, 1940, **211**, 792-794.

182. Dervichian (D. G.). — Couches superficielles de protéines. *Journ. Chim. Phys.*, 1940, **37**, 110-123.

183. Dervichian (D.). — Structure des protéines. Interprétation de la dénaturation et propriétés physicochimiques. *C. R. Acad. Sc.*, 1941, **212**, 86-88.

184. Dervichian (D. G.). — Micelles et macromolécules (émulsions, savons et protéines). *Journ. Chim. Phys.*, 1941, **38**, 59-77.

185. Dervichian (D. G.). — The structure of the protein molecule. *Journ. of Chem. Phys.*, 1943, **11**, 236-246.

186. Dervichian (D.). — Sur la nature des composés antigène-

anticorps et sur leur solubilité. *Ann. Inst. Pasteur*, 1944, **70**, 291-301.

187. Dervichian (D. G.). — Colloïdes et solubilité. *Bull. Soc. Philomat. de Paris*, 1944.

187bis. Dervichian (D.). — *Conférence de la Société Philomatique*, Paris, février 1948.

188. Dervichian (D.) et Grabar (P.). — Mécanisme des réactions antigène-anticorps et structure moléculaire des protéides. *C. R. Acad. Sc.*, 1942, **214**, 195-198.

189. Dervichian (D.) et Lachampt (F.). — Structure des solutions de savons. *Bull. Soc. Chim. de France*, 1944, **11**, 189-206.

190. Dervichian (D.) et Magnant (C.). — Action ménagée de certains agents chimiques sur le sérum. *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, **69**, 380-381.

191. Dessy. — Ricerche sull' immunità antilipoïdes. *C. R. I^er^ Congrès Intern. Microb., Paris*, 1930, t. II, pp. 39-41. Masson et C^ie^, édit.

192. Deutsch. — Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, **13**, 689-727.

193. Devaux (H.). — Membrane de coagulation par simple contact de l'albumine avec l'eau. Application au protoplasme. *P.-V. Soc. Linn. de Bordeaux*, 1904, **59**, 30.

194. Devaux (H.). — Les lames minces d'albumine et leurs caractères physiques. *Bull. Soc. fr. de Phys.*, 1935, n° 376, p. 106 S.

195. Devouassoux (J.). — De l'action du formol et de quelques autres substances antiseptiques pour la conservation des sérums. Thèse Doct. Méd. Vét., Alfort, 1930.

196. Dhéré (Ch.), Meunier (P.) et Castelli (V.). — Sur la détermination, par l'analyse spectrale, du bouillon toxique et de l'anatoxine diphtériques. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 564-567.

197. Diacono (H.). — Séro-diagnostic des infections typhiques. Le rôle des globulines sériques dans l'épreuve de l'agglutination. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 869-871.

198. Dochez (A. R.) et Avery (O. T.). — The elaboration of specific soluble substance by pneumococcus during growth. *Journ. of Exp. Med.*, 1917, **26**, 477-493.

199. Doerr (R.) et Berger (W. Z.). — Der Gehalt des Blutserums an artspezifischen Eiweiss. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh.*, 1921, **93**, 147-162.

200. Doerr (R.) et Friedli. — Kongr. d. Dermat. Ges., 1925.

201. Dognon (A.). — Concentration et séparation par mousses. Quelques applications chimiques et bactériologiques. *In* Sur les phénomènes de mouillabilité et les applications de ces phénomènes. 1 vol., 1942. Hermann et C^ie^ édit., Paris; pp. 157-172.

202. Dormeyer (C.). — Die quantitative Bestimmung von Fetten, Seifen und Fettsäuren in thierischen Organen. *Pflüg. Arch.*, 1896, **65**, 90-108.

203. Dougherty (T. F.), Chase (J. H.) et White (A.). — Relationship of the effects of Adrenal cortical secretion on Lymphoid tissue and on antibody titer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1944, **56**, 28-29.

— The demonstration of antibodies in Lymphocytes. *Ibid*, 1944, **57**, 295-298.

— Pituitary Adrenal cortical control of antibody. *Ibid.*, 1945, **58**, 135-140.

204. Douglas (S. R.) et Dudley (H. W.). — Travail non publié, effectué au National Institue for Medical Research, Hampstead, London; cité par Hartley [342].

205. Douris (R.). — Modifications, sous l'influence du temps, du sérum humain normal ou syphilitique. *C. R. Acad. Sc.*, 1918, **167**, 738.

206. Downs (C. M.) et Goodner (K.). — Effect of certain substances on the precipitin reaction. *Journ. of Inf. Diseases*, 1926, **38**, 240-245.

207. Dubuisson (M.). — Recherches sur les groupes ionisables de la myosine. I. — La courbe de dissociation acide-base. *Arch. Intern. Physiol.*, 1941, **51**, 133-153; II. — La courbe de dissociation acide-base dans la formol-titration. *Ibid.*, 1941, **51**, 154-161.

208. Dujarric de la Rivière (R.). — Au sujet des sérums humains stabilisés par l'action combinée du formol et de la chaleur (formosérums). *Bull. Acad. Méd.*, 1946, **130**, 271-272.

209. Dujarric de la Rivière (R.) et Kossovitch (N.). — Sur la nature des agglutinogènes des globules rouges des différents groupes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1935, **55**, 331-339.

210. Dujarric de la Rivière (R.) et Kossovitch (N.). — Antigènes, hétéro-antigènes et haptènes. 1 vol., 1937. Baillière, édit., Paris.

211. Dujarric de la Rivière (R.) et Kossovitch (N.). — Propriétés des immunsérums obtenus par inoculation aux animaux de sérums sanguins ayant subi l'action de certains agents physiques. Réactions séro-sériques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, **65**, 63-66.

212. Dujarric de la Rivière (R.), Roux (E.) et Kossovitch (N.). — Floculation des sérums en présence de mélanges antigènes-teinture de résine. *Ann. Inst. Pasteur.*, 1929, **43**, 1282-1329.

213. Dulière (W. L.). — Etude sérologique des protéines ninhydrinées. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1122-1124.

214. Dumas (J.), Ramon (G.) et Bilal (S.). — Anatoxine dysentérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1926, **40**, 134-140.

215. Duncan (J. T.). — The use of equivalent proportions of antigen and serum in absorption of precipitin. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1932, **13**, 489-497.

216. Duncan (J. T.). — Optimal agglutination; the significance of the different ratios of serum to bacteria. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1934, **15**, 23-44.

217. Duncan (J. T.). — Specific character of stage of aggregation in agglutination and precipitation of antibody-antibody compounds. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1938, **19**, 328-338.

218. Dungern (F. Von). — Bindungverhältnisse bei der Präcipitinreaktion. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1903, **34**, 355-380.

219. Dungern (F. V.). — Spezifizität der Antikörperbildung. *In* R. Koch's Festschrift, pp. 1-6 (voir [933]).

220. Eagle (H.). — Specific agglutination and precipitation. I. — the Mechanism of the reactions. *Journ. of Immunol*, 1930, 393-417.

221. Eagle (H.). — Specific agglutination and precipitation. II. — Velocity of the reactions. *Journ. of Immunol.*, 1932, **23**, 153-186.

222. Eagle (H.). — Applications of colloid chemistry in the serum diagnosis of syphilis. *Journ. Phys. Chem.*, 1932, **36**, 259-267.

223. Eagle (H.). — The non-identity of the antigenic and antitoxic groups in diphteria antitoxin. *Journ., of Immunol.*, 1936, **30**, 339-344.

224. Eagle (H.). — Some effects of Formaldehyde on the Horse antipneumococcus serum and diphteria antitoxin, and their significance for the theory of antigen-antibody aggregation. *Journ., of Exptl. Med.*, 1938, **67**, 495-514.

225. Eagle (H.), Smith (D. E.) et Vickers (P.). — The effect of combination with diazo compounds on the immunological reactivity of antibodies. *Journ. of Exptl. Med.*, 1936, **63**, 617-643.

226. Eaton (M. D.). — Chemical Modification of purified diphteria toxin. I. — The Mechanism of detoxification by Formaldehyde. *Journ. of Immunol.*, 1937, **33**, 419-436.

227. Ecker (E.). — Comparison of formol and Wassermann reaction in diagnosis of syphilis. *Journ. of Inf. Diseases*, 1921, **29**, 359-361.

228. Ecker (E. E.) et Pillemer (L.). — The specificity of oxidized and reduced proteins of the ocular lens. *Journ. of Exptl. Med.*, 1940, **71**, 585-590.

229. Eggerth. — The effect of ninhydrin upon Horse serum-proteins and antibodies. *Journ. of Immunol.*, 1941, **42**, 199-218.

— The effect of ninhydrin upon Rabbit serum-proteins and antibodies. *Journ. of Immunol.*, 1942, **45**, 303-314.

230. Ehrich (W. E.) et Harris (T. N.). — The formation of antibodies in the popliteal lymph node in Rabbits. *Journ. of Exptl. Med.*, 1942, **76**, 335-347 (2 planches hors-texte).

231. Ehrich (W. E.) et Harris (T. N.). — The site of antibody formation. *Science*, 1945, **101**, 28-31.

232. Ehrlich (P.). — Studies on Immunity. Traduction anglaise de Charles Boldrean. 1 vol., 1906. John Wiley et Sons, New-York.

233. Eisler (D. M.). — Influence of collodion particles on the visible end point in antibody titrations. *Journ. of Immunol.*, 1941, **42**, 408-418.

234. Eisler (M.). — Ueber den Einfluss von Präzipitin auf Toxin-Antitoxin Verbindungen. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasit.*, 1920, **84**, 46-60.

235. Eisler (M.). — Uber die Reaktion von Antigen und Antikörper nach Bindung des einen von ihnen an Kohle. *Biochem. Zeit.*, 1922, **135**, 416-441.

236. Eisler (M. Von) et Lowenstein (E.). — Ueber den Einfluss des Formaldehydes auf Blutserum. *Zentralbl. f. Bakt., T. orig.*, 1912, **63**, 261-287.

237. Elford (W. J.), Grabar (P.) et Fischer (W.). — Ultrafiltration studies with normal horse serum. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 92-99.

238. Enders (J. F.). — A type specific substance distinct from the specific carbohydrate in pneumococcus type I. *Journ. of Exptl. Med.*, 1930, **52**, 235-252.

239. Enders (J. F.) et Hammon (W. D.). — Active and passive immunization against the virus of Malignant panleucopenia of cats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1940, **43**, 194-200.

240. Enders (J. F.) et Wu (C. J.). — Immunological study of the A substance of acetyl polysaccharide of pneumococcus type I. *Journ. of Exptl. Med.*, 1934, **60**, 127-147.

241. Erlandsen (A.). — Untersuchungen über die lecithinartigen Substanzen des Myocardiums und der quergestreiften Muskeln. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1907, **51**, 71-155.

242. Erlenmeyer (H.) et Berger (E.). — Untersuchungen über die Bedeutung der Struktur der Antigene für die Entstehung und für die Spezifität der Antikörper. *Biochem. Zeit.*, 1932, **252**, 22-36.

243. Espil. — Sur l'emploi du méthylal comme solvant en chimie analytique. *Bull. Soc. Chim. de France.*, 1934, 5e Sér., **1**, 1502-1503.

244. Etinger-Tulczynska (R.). — Bakterienkapseln und « Quellungsreaktion ». *Zeitschr. f. Hyg.*, 1933, **114**, 769-787.

245. Ettisch (G.) et Sachsse (H.). — Zur Frage der chemischen

Selbständigkeit der Serumproteine. *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **230**, 129-135.

246. Euler (H. V.) et Brunius (E.). — Ueber die Reinigung hämolytischer Antikörper. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1930, **68**, 124-136.

247. Faillie (R.), Jonnard (R.) et Zuckerkandl (F.). — Etude du pouvoir réactionnel du sérum sanguin par la méthode réfractométrique. *Biol. Méd.*, 1938, **28**, 129-152.

248. Falco (R. J. de). — A comparison of antigens by interfacial and nephelometric methods. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, **46**, 500-502.

249. Fanconi (G.). — Zur Frage des sogenannten Künstlichen Globulins. *Biochem. Zeitschr.*, 1923, **139**, 321-335.

250. Faure (M.). — Les haptènes lipoïdiques de fixation de l'alexine. Recherches sur l'haptène lipoïdique et les phosphatides du Bacille Tuberculeux. Thèse Dot. ès Sciences, Paris, 1940.

251. Fell (N.), Stern (N. G.) et Coghill (R. D.). — A physical-chemical study of normal and immune Horse sera. *Journ., of Immunol.*, 1940, **39**, 223-246.

252. Felton (L. D.). — *Journ. of Inf. Diseases*, 1925, **37**, 189.

253. Felton (L. D.). — Studies on the protective substance in antipneumococcus serum. Study III : the protective substance in types I, II and III antipneumococcus sera. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 1926, **38**, 33-60.

254. Felton (L. D.). — The use of Ethyl alcohol as precipitant in the concentration of antipneumococcus serum. *Journ. of Immunol.*, 1931, **21**, 357-373.

255. Felton (L. D.). — Dissociation of the specific protein precipitate of antipneumococcus horse serum and a comparison with a protein isolated by chemical means from this immune serum. *Journ. of Immunol.*, 1932, **22**, 453-467.

256. Felton (L. D.) et Stahl (H. J.). — Standardization of antipneumococcus horse sera and concentrates. *Nat. Inst. Health. Bull.*, 1937., n° 169, pp. 1-58.

257. Felton (L. D.) et Kauffmann (G.). — The lipoidal content of antipneumococci horse serum. *Journ. of Inf. Diseases*, 1933, **34**, 343-548.

258. Fierz (H. E.), Jadassohn (W.) et Margot (A.). — Anaphylaktisierung und Anaphylaxieauslösung durch eine chemische bekannte Substanz : Oleyl-N-methyl-taurin. *Helv. Chim. Acta*, 1938, **21**, 293-301.

259. Fischer (A.). — The transformation of serum albumin into serum globulins. *Science*, 1932, **75**, 443.

260. Fischer (O.). — Untersuchungen über die chemische Natur der sogenannten Syphilisantigene. X Entfernung einer inaktiven Fraktion. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1937, **90**, 348-352.

261. Fitzgerald (J. G.). — Etudes sur les sérums normaux et spécifiques (spermotoxiques). *Ann. Inst. Pasteur.*, 1910, **24**, 973-983.

262. Fitzgerald (J. G.). — L'anatoxine diphtérique dans la prévention de la diphtérie au Canada. *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, **42**, 1089-1097.

263. Fleischmann (P.) et Michaelis (L.). — Die Formulierung der Präzipitinreaktion nach Hamburger und Arrhenius. *Biochem. Zeitschr.*, 1907, **3**, 425-430.

264. Flössner (O.) et Kutscher (F.). — Zur Kenntniss der Ramonschen Flockungsreaktion. *Mund. Med. Woch.*, 1924, **71**, 576.

265. Fodor (J. Von). — Die Fähigkeit des Blutes Bacterien zu vernichten. *Deutsch. Med. Woch.*, 1887, **13**, 745-747.

266. Follensby (E. M.) et Hooker (S. B.). — Reaction between Diphteria Toxin and Formaldehyde. *Journ. of Immunol.*, 1936, **31**, 141-154.

267. Follensby (E. M.) et Hooker (S. B.). — The effect of temperature upon combination and aggregation and upon equilibrium in the reaction between antigen and antibody. *Journ. of Immunol.*, 1939, **37**, 367-382.

268. Fornet (W.) et Müller (M.). — Praktische und theorische Präcipitin Untersuchungen. — II Mitteilung. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 1910, **66**, 215-246.

269. Forssmann (J.). — Die Herstellung hochwertiger spezifischer Schafhämolysine ohne Verwendung von Schafblut. Ein Beitrag zur Lehre von heterologer Antikörperbildung. *Biochem. Zeitschr.*, 1911, **37**, 78-115.

270. Forsmann (J.). — Influence de l'éther sur la séro-réaction de Wassermann. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **85**, 828-830.

271. Forsmann (J.). — Chemical studies on the Wassermann substances and of the antibodies IV. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1925, **1**, 5-22.

— Zur chemie der Wassermannreaktion und der Antikörper III. *Biochem. Zeitschr.*, 1924, **148**, 160-186.

— Influence du formol sur la substance de Bordet-Wassermann et sur les anticorps. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 471-473.

272. Fowler (R. H.). — Statistical Mechanics. 1 vol., 1936, Cambridge.

273. Fraenkel (M.). — A Method of separating antibodies from serum proteins. Investigation on a protein-free antibody. *Proc. Roy. Soc., Ser. B.*, 1932, **111**, 165-174.

274. Fraenkel-Conrat (H.), Lewis (J. C.), Dimick (K. P.), Edwards (B.), Reitz (H. C.), Ferrel (R. E.), Brandon (B. A.) et Olcott (H. S.). — Succinic acid derivatives of grami-

cidin and methylol gramicidin. *Arch. of Biochem.*, 1946, **10**, 553-555.

275. Fraenkel-Conrath (H.) et Olcott (H. S.). — Reaction of formaldehyde with proteins. II. — Participation of the guanidyl groups and evidence of cross-linking. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 34-37.

276. France (W. G.). — Crystal structure and adsorption from solution. *Coll. Symp. Mono.*, 1930, **7**, 59-87.

277. Freemann (M.). — The action of dilute formaldehyde solutions on protein and protein derivatives. *Australian Journ. Exptl. Biol. Med.*, 1930, **7**, 117-124.

278. French (D.) et Edsall (J. T.). — The reaction of Formaldehyde with amino acids and proteins. *Adv. in Prot. Chem.*, 1945, **2**, 277-335.

279. Freund (E.) et Joachim (J.). — Zur Kenntniss der Serum Globuline. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. phys. Chem.*, 1902, **36**, 407-440, plus 4 pl. hors-texte.

280. Freund (J.). — Toxin-Antitoxin reaction without neutralization. *Journ. of Exptl. Med.*, 1932, **55**, 181-190.

281. Freymann (M.) et Freymann (R.). — Interprétation de diverses propriétés chimiques par l'hypothèse de la liaison hydrogène; spectres d'adsorption infra-rouge. *Bull. Soc. Chim. France*, 1937, **4**, 944-950.

282. Friedberger (E.). — Ueber das Verhalten der Präzipitate gegenüber der Fäulnis. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1907, **43**, 490-494.

283. Friedberger (S.) et Goldsmith (S.). — Uber Anaphylaxie. VII Mitteilung. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1910, **6**, 299-304.

284. Frieden (E. H.), Dunn (M. S.) et Coryell (C. D.). — Quantitative investigations of aminoacids and peptides. VII Equilibria beween aminoacids and Formaldehyde. *Journ. Phys. Chem.*, 1942, **46**, 215-221.

285. Fujio (O.). — *Biochem. Journ.* (Japan), 1941, **33**, 241.

286. Fujiwara (K.). — Kochkoaguliertes Serum als Präzipitogen. *Deutsch. Zeitschr. f. gesamte gerichtliche Med.*, 1922, **1**, 562-565.

287. Fuld (E.) et Spiro (K.). — Ueber die labende und labhemmendewirkung des Blutes. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1900, **31**, 132-155.

288. Furth (J.). — Antigenic character of heated proteins. *Journ. of Immunol.* 1925, **10**, 777-789.

289. Furth (J.) et Landsteiner (K.). — Studies on the precipitable substance of bacilli of the Salmonella group. *Journ. of Exptl. Med.*, 1929, **49**, 727-743.

290. Gara (P. Von). — Untersuchungen über die Natur der Antikörper. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1931, **71**, 1-75,

291. Gara (P. F. de) et Angevine (D. M.). — Studies on the site of antibody formation in rabbits following intracutaneous injections of pneumococcus or of streptococcus vaccine. *Journ. of Exptl. Med.*, 1943, **78**, 27-39.

292. Gate et Papacostas. — Action du formol sur les solutions colloïdales autres que les sérums humains. Expériences basées sur la précipitation des albumines des sérums syphilitiques par ce formol. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **85**, 1029-1030.

293. Gaunt (W. E.) et Wormall (A.). — Immunological and Chemical properties of carbobenzyloxyproteins. I. — Serum Globulin and egg albumin derivatives. II. — Insulin derivatives. *Biochem Journ.*, 1939, **33**, 908-919.

294. Gay (F. P.). — The fixation of Alexines by specific serum precipitates. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1905, **39**, 603-610.

295. Gell (P. G. H.), Harington (C. R.) et Rivers (R. P.). — The antigenic function of simple chemical compounds. Production of precipitins in Rabbit. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1946, **27**, 267-286.

296. Gengou (O.). — Sur les sensibilisatrices des sérums actifs contre les substances albuminoïdes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1902, **16**, 734-755.

297. Gerlough (T. D.). — Refining Antitoxins. *U. S. Patent*, 2.368.464 (30 janvier 1945).

298. Ghedini (G.). — Nachweis des Pfeifferschen Bacillus im Blute und in der Milz bei Influenza. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1907, **43**, 407-415.

299. Glenny (A. T.), Hopkins (B. E.) et Pope (C. G.). — Further notes on modification of Diphteria toxin by Formaldehyde. *Journ. Path. Bact.*, 1924, **27**, 266-270.

300. Glenny (A. T.), Pope (C. G.), Waddington (H.) et Wallace (H.). — Immunological notes. XVIII. — Destruction of toxin by heating in the presence of phenol. *Journ. Path., Bact.*, 1925, **29**, 32-36.

301. Glenny (A. T.), Pope (C. G.), Waddington (H.) et Wallace (U.). — Immunological notes. XXI. — The effect of Formaldehyde on diphteria antitoxic serum. *Journ. Path. Bact.*, 1926, **29**, 36-37.

302. Gœbel (W. F.). — The preparation of type specific polysaccharides of pneumococcus. *Journ. of Biol. Chem.*, 1930, **89**, 395-398.

303. Gœbel (W. F.). — Studies on antibacterial immunity induced by artificial antigens. *Journ. of Exptl. Med.*, 1939, **69**, 353-364.

304. Gœbel (W. F.) et Avery (O. T.). — The soluble specific

substance of Friedländer's bacillus. III. — On the isolation and properties of the specific carbohydrates from type A and C Friedländer bacillus. *Journ. of Exptl. Med.*, 1927, **46**, 601-607.

305. Gœttsch (E.) et Kendall (F. E.). — Analysis of albumin and Globulin in Biological fluids by the quantitative precipitin method. *Journ. of Biol. Chem.*, 1935, **109**, 221-231.

306. Goldie (H.). — Récupération de l'antitoxine diphtérique floculée par la toxine en utilisant les sels sodiques de l'acide aminonaphtalène-trisulfonique. *C. R. Soc. Biol*, 1935, **118**, 220-223.

307. Goldie (H.). — Stabilisation et récupération de l'antitoxine diphtérique floculée par la toxine. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1401-1403.

308. Goldie (H.). — Inactivation du filtrat diphtérique toxique par le cétène. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 974-977.
— Influence du cétène sur la toxine diphtérique purifiée par dialyse. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **126**, 977-980.

309. Goldie (H.) et Sandor (G.). — Influence de l'acétylation par le cétène sur les propriétés antigéniques et anaphylactogènes des protéides sériques du sérum antidiphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 291-295.

310. Goldie (H.) et Sandor (G.). — Relation entre les fonctions amines primaires et les caractères antigéniques des protéines du sérum antidiphtérique de Cheval. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 944-947.

311. Goldsworthy (N. E.). — The occurence of Multiple zones in the serum precipitation reaction. *Journ. Path. Bact.*, 1928, **31**, 525-539.

312. Gonzalez (P.) et Armangué (M.). — Les lipoïdes dans l'immunité. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 1006-1008.

313. Goodner (K.). — Collodion fixation : a new immunological reaction. *Science*, 1941, **94**, 241-242.

314. Goodner (K.), Horsfall (F. L. Jr.) et Bauer (J. H.). — Ultrafiltration of type I antipneumococcal serum. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1936, **34**, 617-619.

315. Goodner (K.) et Horsfall (F. L. Jr.). — The protective action of type I antipneumococcus serum in mice. I. — The quantitative aspect of the mouse protection test. *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **62**, 369-374.

316. Goodner (K.) et Horsfall (F. L. Jr.). — The Protective action of type I Antipneumococcus serum in Mice. V. — The effect of added lipids on the protective Mechanism. *Journ. of Exptl. Med.*, 1936, **64**, 377-383.

317. Goodner (K.) et Horsfall (F. L. Jr.). — Properties of the type specific proteins of antipneumococcus sera. II. —

Immunological fractionnation of type I Antipneumococcus Horse and Rabbit sera. *Journ. of Exptl., Med.*, 1937, **66**, 425-435.

318. Grabar (P.). — Sur l'action de la pepsine sur les anticorps antipneumococciques. *C. R. Acad. Soc.*, 1938, **207**, 807-809.

319. Grabar (P.). — Modification des anticorps antipneumococciques sous l'action de la pepsine. *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **61**, 764-766.

320. Grabar (P.). — La technique immunochimique quantitative et son emploi en immunologie et en chimie. *In* Loiseleur (J.) [534], chap. VI, pp. 626-641.

321. Grabar (P.) et Dervichian (D.). — Rapports quantitatifs entre antigènes et anticorps dans les précipitations spécifiques en relation avec la structure moléculaire. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 74-79.

322. Grabar (P.) et Oudin (J.). — Etude sur les composés solubles de la réaction de précipitation spécifique (anticorps de Cheval-Polyoside du pneumocoque, type VIII). *Ann. Inst. Pasteur*, 1945, **71**, 394-405.

323. Grabar (P.) et Oudin (J.). — Essai d'immunisation par injection d'un précipité spécifique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 166-168.

324. Grabar (P.) et Oudin (J.). — Etude quantitative du système précipitant ovalbumine-anticorps homologue de Lapin. — I : Sur les composés solubles de la zone d'inhibition et leur précipitation par l'alcool. *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, **69**, 195-204.

325. Grafe (V.). — Zur Physiologie und Chemie der Pflanzenphosphatide. *Bioch. Zeitschr.*, 1925, **159**, 444-448.
— et Magistris (H.). — *Id.* II Mitteilung : Die wasserlöslichen Phosphatide aus Aspergillus. *Ibid*, 1925, **162**, 366.
— *Id.* III Mitteilung : Die wasserlöslichen und wasserunlöslichen Phosphatide aus Pisum arvense unicolor (Möystod. Gelbgrüme Erbse Ernte 1925). *Ibid*, 1927, **176**, 266-290.

326. Graham (E. A.). — The influence of ether and ether anesthesia on Bacteriolysis, Agglutination and Phagocytosis. *Journ. of Inf. Diseases*, 1911, **8**, 147-175.

327. Grasset (E.) et Zoutendyk (A.). — Detoxification of snake venoms and the application of the resulting antigens to rapid methods of antivenimous vaccination and serum proportion. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1933, **14**, 308-317.

328. Grégoire. — Thèse Doct. ès Sciences, Paris, 1945.

329. Grégoire, Machebœuf (M.), Grabar (P.) et Lépine. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, cité par Machebœuf [560].

330. Grigaut (A.). — Méthode de dosage de la cholestérine dans le

sérum et dans les tissus. II. — Procédé colorimétrique. *C. R. Soc. Biol.*, 1911, **71**, 513-515.

331. Grohmann (W. Von). — Ueber die Einwirkung der Zellenfreien Blutplasma auf einige pflanzliche Mikroorganismen (Schimmel-, Spross-, pathogene und nicht pathogene Spaltpilze). Eine Untersuchungen aus dem physiol. Institut zu Dorpat. 1 vol., 1884. Kruger, édit., Dorpat.

332. Grünbaum (A. S. F.). — Note on the « Blood relationship » of man and the anthropoid apes. Lancet, 1902, vol. I, 143.

333. Gutman (N.). — Recherches sur le caractère antigénique de la clupéine couplée à des noyaux aromatiques. *Revue d'Immunol.*, 1938, **4**, 111-129.

334. Halban (J.) et Landsteiner (K.). — Zur Frage der Präcipitationsvorgänge. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1902, **32**, 457-458.

335. Hammarsten (O.). — Ueber die Anwendbarkeit des Magnesiumsulfates zur Trennung und quantitative Bestimmung von Serum-Albumin und Globulin. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1883-1884, **8**, 467-502.

336. Handowsky (H.) et Wagner (R.). — Uber einige physikalisch chemische Eigenschaften von Lecithinemulsionem und Lecithineiweis mischungen. *Biochem. Zeitschr.*, 1911, **31**, 32-45.

337. Hanks. — A ring precipitin test for estimating the concentration of antibody in small amounts of immune serum. *Journ. of Immunol.*, 1935, **28**, 95-104.

338. Hansteen-Cranner. — *Ber. d. Botan. Ges.*, 1919, **37**, 380.

339. Hardy (W. B.). — Colloidal Solution. The Globulins. *Journ. of Physiol.*, 1905, **33**, 251-337.

340. Hardy (W. B.) et Gardiner (S.). — Proteins of blood plasma. *Journ. of Physiol.*, 1910, **40**, LXVIII-LXXI.

341. Harris (T. N.), Grimm (P.), Mertens (E.) et Ehrich (W. E.). — The rôle of the lymphocyte in antibody formation. *Journ. of Exptl. Med.*, 1945, **81**, 73-83.

342. Hartley (P.). — Observations on the *rôle* of the ether-soluble Constituents of serum in certain serological reactions. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1925, **6**, 180-196.

343. Hartley (P.). — The antigenic properties of precipitates produced by the interaction of diphteria toxin and antitoxin. Part 2. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1926, **7**, 55-68.

344. Haslam (H. C.). — Separation of proteins. Part III. Globulins. *Biochem. Journ.*, 1913, **7**, 492-516.

345. Hattori (K.). — Kolloïdstudien über den Bau der roten Blutköperchen und über Hämolyse. — III : Ultramikroskopische Untersuchungen an Lipoïden. *Biochem. Zeitschr.*, 1921, **119**, 45-64.

346. Haurowitz (F.) et Breinl (F.). — Quantitative Untersuchung der Verteilung eines arsenhaltigen Antigens im Organismus. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1932, **205**, 259-270.

347. Haurowitz (F.). — Uber die Bindung zwischen Antigen und präzipitierenden Antikörper. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1937, **245**, 23-40.

348. Haurowitz (F.). — Fortschritte der Allergielehre, 1939, **19**.

349. Haurowitz (F.), Vardar (M.) et Schwerin (P.). — The specifis group of antibodies. *Journ. of Immunol.*, 1942, **43**, 327-330.

350. Haurowitz (F.), Tunca (M.) et Schwerin (P.). — The failure of azo-gelatin as an antigen. *Biochem. Journ.*, 1943, **37**, 249-250.

351. Haurowitz (F.) et Breinl (F.). — Chemische Untersuchung der spezifischen Bindung von Arsanil-Eiweis und Arsanilsaüre an Immunserum. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1933, **214**, 111-120.

352. Haurowitz (F.) et Bursa (F.). — Serological differences between native and denatured proteins. *Revue de la Faculté des Sciences de l'Université d'Istanbul*, Série B, 1945, **10**, 283-287.

353. Haurowitz (F.) et Schwerin (P.). — The valence of antibodies and the structure of antigen-antibody precipitates. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1942, **23**, 146-150.

354. Haurowitz (F.) et Schwerin (P.). — The specific of antibodies to antigens containing two different groups. *Journ., of Immunol.*, 1943, **47**, 111-119.

355. Haurowitz (F.) et Tanasoglu (P.). — Serum Globulins and antibodies. *Istanbul Seririyati*, 1944, **26**, 63-65.

356. Healey (H.) et Pinfeld (S.). — An *in vitro* investigation of the reaction between diphteria toxin and antitoxin. *Brit. Journ. Exptl., Path.*, 1935, **16**, 535-553.

357. Heidelberger (M.). — Les aspects chimiques de la fonction antigène et leurs rapports avec les agents infectieux. *Rev. d'Immunol.*, 1938, **4**, 293-303.

358. Heidelberger (M.). — Quantitative absolute Methods in the study of antigen-antibody reactions. *Bact. Reviews*, 1939, **3**, 49-95.

359. Heidelberger (M.) et Mc Pherson (C. F. C.). — Quantitative micro-estimation of antibodies in the sera of man and other animals. *Science*, 1943, **97**, 405-406.

360. Heidelberger (M.). — Immunochemistry; *in* Green : Currents in Biochemical research. 1 vol., 1946, Interscience Publ., New-York,

361. Heidelberger (M.) et Avery (O. T.). — The soluble specific substance of pneumococcus I. *Journ. of Exptl. Med.*, 1923, **38**, 73-79.

— The soluble specific substance of pneumococcus II. *Ibid.*, 1924, **40**, 301-316.

362. Heidelberger (M.), Grabar (P.) et Treffers (H. P.). — Quantitative studies on antibody purification. — VII : The reaction of dissociated antibody with specific polysaccharide and the effect of Formaldehyde. *Journ. of Exptl., Med.*, 1938, **68**, 913-922.

363. Heidelberger (M.) et Kabat (E. A.). — Chemical Studies on bacterial agglutination. — III : A reaction mechanism and a quantitative theory. *Journ. of Exptl. Med.*, 1937, **65**, 885-902.

364. Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — A quantitative Study of the precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody. *Journ. of Exptl. Med.*, 1929, **50**, 809-823.

365. Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — Specific and non-specific polysaccharides of type IV pneumococcus. *Journ. of Exptl. Med.*, 1931, **53**, 625-639.

366. Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — Quantitative Studies on the precipitin reaction. The determination of small amounts of a specific polysaccharide. *Journ. of Exptl. Med.*, 1932, **55**, 555-561.

367. Heidelberger (M.). et Kendall (F. E.). — Some physical properties of specific polysaccharides. *Journ. of Biol., Chem.*, 1932, **95**, 127-142.

368. Heidelberger (M.). et Kendall (F. E.). — The molecular weight of specific polysaccharides. *Journ. of Biol. Chem.*, 1932, **96**, 541-558.

369. Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — Studies on the precipitin reaction. Precipitation haptens; species differences in antibodies. *Journ., of Exptl. Med.*, 1933, **57**, 373-379.

370. Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — Quantitative Studies on the precipitin reaction. Antibody production in Rabbits injected with an azoprotein. *Journ. of Exptl. Med.*, 1933, **58**, 137-152.

371. Heidelberger (M.). et Kendall (F. E.). — The precipitation reaction between type III pneumococcus polysaccharide and homologous antibody. — II : Conditions for quantitative precipitation of antibody in Horse Sera. *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **61**, 559-562.

372. Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — Id. III : A quantitative study and a theory of the reaction mechanism. *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **61**, 563-591.

373. Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — A quantitative theory of the precipitin reaction. — II : A Study of an azo protein-antibody system. *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **62,** 467-483.

374. Heidelberger (M.). et Kendall (F. E.). — *Ibid.* III : The reaction between crystalline egg-albumin and its homologous antibody. *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **62,** 697-720.

375. Heidelberger (M.) et Kendall (F. E.). — Quantitative studies on antibody purification. — I : the dissociation of precipitates formed by pneumococcus specific polysaccharide and homologous antibody. *Journ. of Exptl. Med.*, 1936, **64,** 161-172.

376. Heidelberger (M.), Kendall (F. E.) et Scherp (H. W.). — The specific polysaccharides of type I, II and III pneumococcus. A revision of methods and data. *Journ. of Exptl. Med.*, 1936, **64,** 559-572.

377. Heidelberger (M.), Kendall (F. E.) et Soo-Hoo (C. M.). — Quantitative Studies on the precipitin reaction. Antibody production in Rabbit, injected with an azo protein. *Journ. of Exptl. Med.*, 1933, **58,** 137-152.

378. Heidelberger (M.), Kendall (F. E.) et Teorell (T.). — Quantitative Studies on the precipitin reaction. Effect of salts on the reaction. *Journ. of Exptl. Med.*, 1936, **63,** 819-826.

379. Heidelberger (M.) et Landsteiner (K.). — On the antigenic properties of hemoglobin. *Journ. of Exptl. Med.*, 1923, **38,** 561-571.

380. Heidelberger (M.). et Pedersen (K. O.). — The Molecular weight of antibodies. *Journ. of Exptl. Med.*, 1937, **65,** 393-414.

381. Heidelberger (M.), Sia (R. H. P.) et Kendall (F. E.). — Specific precipitation and mouse protection in type I antipneumococcus sera. *Journ. of Exptl. Med.*, 1930, **52,** 477-483.

382. Heidelberger (M.), Treffers (H. P.) et Mayer (M.). — A quantitative theory of the precipitin reaction. — VII : the egg albumin-antibody reaction in antisera from the Rabbit and Horse. *Journ. of Exptl. Med.*, 1940, **71,** 271-282.

383. Heidelberger (M.), Treffers (H. P.), Schœnheimer (R.), Ratner (S.) et Rittenberg (D.). — Behaviour of antibody protein toward dietary nitrogen in active and passive immunity. *Journ. of Biol. Chem.*, 1942, **144,** 555-562.

384. Hektœn (L.). — On the local production of antibodies. *Journ. of Inf. Diseases*, 1911, **9,** 103-114.

385. Hektœn (L.). — The specific precipitin reaction of the normal and cataractous lens. *Journ. of. Inf. Diseases*, 1922, **31,** 72-78.

386. Hektœn (L.) et Boor (A. K.). — Simultaneous Multiple immunization. *Journ. of Inf. Diseases*, 1931, **48,** 588-594.

387. Hektœn (L.) et Welker (W. H.). — The specificness of the negative phase in precipitin production. *Journ. of Inf. Diseases,* 1935, **57,** 337-344.

388. Hektœn (L.) et Manly (L. S.). — Specific precipitin reaction of semen. *Journ. of Inf. Diseases,* 1923, **32,** 167-171.

389. Hektœn (L.) et Schulhof (K.). — Further observations on lens precipitins : antigenic properties of alpha and beta crystallins. *Journ. of Inf. Diseases,* 1924, **34,** 433-439.

390. Henley (R. R.). — Changes in the protein and the gelification of formolized Blood Serum. *Journ. of Biol. Chem.,* 1923, **57,** 139-151.

391. Henry (A. F. X.). — Sérofloculation palustre. Méthodes Photométriques. *Arch. Inst. Prophyl.,* 1929, **1,** 341-350.

392. Hershey (A. D.). — A Descriptive theory of specific precipitation. — I : the theory., *Journ. of Immunol.,* 1941, **42,** 455-484.

393. Hewitt (F.). — Optical rotatory power and dispersion of proteins. *Biochem. Journ.,* 1927, **21,** 216-224.

394. Hewitt (L. F.). — Note on the Mechanism of Diphteria toxoid formation. *Biochem. Journ.,* 1930, **24,** 983-992.

395. Hewitt (L. F.). — Chemistry of antibodies and serum proteins. — I : Nitrogen distribution and aminoacids. II : Protein carbohydrate groups. *Biochem. Journ.,* 1934, **28,** 2080-2087.

396. Heymans (M.). — L'immunisation par la ricine et le venin formolés. *Arch. Intern. Pharm. Thérap.,* 1926, **32,** 101-129.

397. Hirst (G. K.), Richard (E. R.), Whitman (L.), Horsfall (F. L. Jr.). — Antibody response of human beings following vaccination with influenza virus. *Journ. of Exptl. Med.,* 1942, **75,** 495-511.

398. Hœn (E.) et Tscherkow (L.). — Ueber die Möglichkeit, im Diphterieheiserum, die präzipitierende Funktion von der Antitoxischen durch Temperatur Einwirkung zu trennen. *Zeitschr. f. Immunitätsf.,* 1929, **62,** 201-206.

399. Hœn (E.), Tscherkow (L.) et Zipp (W.). — Studien über das Wesen des « Lp » des Diphterietoxins. *Zeitschr. f. Immunitätsf.,* 1926, **48,** 191-206.

400. Hofmeister (F.). — Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Dritte Mitteilung. *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.,* 1889, **25,** 1-30.

— Fünfte Mitteilung : Untersuchungen über den Quellungsvorgang. *Ibid.,* 1980, **27,** 395-413.

— Sechste Mitteilung : Die Beteiligung gelöster Stoffe an Quellungsvorgängen. *Ibid.,* 1890, **28,** 210-238.

401. Holden (H. F.) et Freeman (M.). — The action of Dilute formaldehyde solution on some aminoacids. *Australian Journ. Exp. Biol. Med. Sc.,* 1931, **8,** 189-198.

402. Holmes. — *Journ. Biol. Med.*, 1941, **14**, 145.
403. Homer (A.). — Condensation of tryptophane with certain aldehydes. *Proc. Camb. Phil. Soc.*, 1912, **16**, 405-408.
404. Homer (A.). — The condensation of tryptophane and other indole derivatives with certain aldehydes. *Biochem. Journ.*, 1912, **7**, 101-115.
405. Hooker (S. B.). — The Nature of antibodies. *Journ. of Immunol.*, 1937, **33**, 57-74.
406. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — A quantitative aspect of the hypothetical incorporation of injected antigen in resulting antibody. *Journ. of Immunol.*, 1931, **21**, 113-115.
407. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — A quantitative aspect of the hypothetical incorporation of injected antigen in resulting antibody. — II : Experimental. *Journ. of Immunol.*, 1932, **23**, 465-479.
408. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — The alleged transformation of serum albumin into serum globulins. *Journ. of Biol. Chem.*, 1933, **100**, 187-194.
409. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — The Mechanism of Antibody-Antigen Combination. *Proc. XV th. Intern. Physiol. Congr.*, 1 vol., 1935, *State Biological and Medical édit., Moscow;* p. 567.
410. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — Two antigens of high molecular weight : Hemocyanin of Limulus Polyphemus and Fulgur Caniculatus. *Journ. of Immunol.*, 1936, **30**, 33-40.
411. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — The existence of antigenic determinants of diverse specificity in a single protein. — III : Further notes on crystalline Hen- and Duck- ovalbumins. *Journ. of Immunol.*, 1936, **30**, 41-49.
412. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — The non specificity of the flocculative phase of serological aggregation. *Journ. of Immunol.*, 1937, **33**, 337-357.
413. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — A Test of the Lattice hypothesis with a bivalent hapten. *Arch. of Path.*, 1939, **28**, 754.
415. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — A Test of the alternation (« Lattice ») hypothesis with bivalent and trivalent haptens. *Journ. of Immunol.*, 1941, **42**, 419-423.
416. Hooker (S. B.) et Boyd (W. C.). — Widened reactivity of antibody produced by prolonged immunization. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, **47**, 187-190.
417. Hopkins (S. J.) et Wormall (A.). — Phenyl isocyanate protein compounds and their immunological properties. *Biochem. Journ.*, 1933, **27**, 740-753.
— Phenyl isocyanate protein derivatives and their immunological properties. — III : The aminoacid derivatives and serological inhibition tests. *Biochem. Journ.*, 1934, **28**, 228-236.

418. Hopkins (S. J.) et Wormall (A.). — Phenyl isocyanate protein compounds and their immunological properties. — II : The gelatin compounds. *Biochem. Journ.*, 1933, **27**, 1706-1715.

419. Hoppe-Seyler (F.). — *Mediz. Chem. Untersch. a. d. Labor. f. angew. Chem., Tubingen*, 1867 à 1871, **2**, 215; **3**, 391 et **4**, 486.

421. Hornus (G. J. P.) et Grabar (P.). — Relations quantitatives entre l'antigène glucido-lipidique O et l'haptène glucidique du Bacille Typhique et les immunsérums de Lapin. *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, **66**, 136-158.

422. Horsfall (F. L. Jr.). — Formaldehyde and serum proteins. Their immunological characteristics. *Journ. of Immunol.*, 1934, **27**, 553-567.

423. Horsfall (F. L. Jr.) et Goodner (K.). — Lipids and Immunological reactions. — I : The relation of phospholipins to the type specific reactions of antipneumococcus Horse and Rabbit sera. *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **62**, 485-503.

424. Horsfall (F. L. Jr.) et Goodner (K.). — *Ibid.* — II : Further experiments on the relation of lipids to the type specific reactions of antipneumococcus sera. *Journ. of Immunol.*, 1936, **31**, 135-140.

425. Horsfall (F. L. Jr.) et Goodner (K.). — *Ibid.* — III : Lipid content of specific precipitates from type I antipneumococcus sera. *Journ. of Exptl. Med.*, 1936, **64**, 583-589.

426. Horsfall (F. L. Jr.) et Goodner (K.). — *Ibid.* — IV : The lipid patterns from specific precipitates from type I antipneumococcus sera. *Journ. of Exptl. Med.*, 1936, **64**, 855-863.

427. How (A. E.). — A note on the calculation of antibody-antigen ratio. *Journ. of Immunol.*, 1939, **37**, 77-83.

428. How (E.). — The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. *Journ. of Biol. Chem.*, 1921, **49**, 93-107.

429. Huddelson (F.) et Pennel. — *Michigan Agr. Expt. Stat. Bull.*, 1937, **156**, 31.

430. Huggins (M. L.). — Some hydrogen bridge models for globular proteins. *Journ. of Chem. Phys.*, 1940, **8**, 598-600.

431. Huntoon (F. M.) et Etris (S.). — Antibody Studies. — II : The recovery of antibody from sensitized antigens : Technic. *Journ. of Immunol.*, 1921, **6**, 123-184.

432. Huntoon (F. M.), Masucci (P.) et Hannum (F.). — Antibody Studies. — III : Chemical Nature of antibody. *Journ. of Immunol.*, 1921, **6**, 185-200.

433. Hurwitz (S. H.) et Meyer (K. F.). — Studies on the blood proteins. — I : The serum globulins in bacterial infection and immunity. *Journ. of Exptl. Med.*, 1916, **24**, 515-546.

434. Ionesco-Mihaiesto (C.) et Damboviceanu (A.). — Modifications

de certaines constantes du sérum de Cheval au cours de l'immunisation. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104,** 1357-1359.

435. Ivanovics (G.). — Unter welchen Bedingungen werden bei der Nährbodenzüchtung der Milzbrandbazillen Kapseln gebildet ? *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1937, **138,** 449-455.

436. Iwanoff (K.). — Uber die Wirkung des Formalins auf Antikörper. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.*, 1936, **118,** 197-203.

437. Jacob (W. A.) et Craig (L. C.). — The ergot alkaloids. — VIII : The synthesis of 4-carboline carbonic acids. *Journ. of Biol. Chem.*, 1933, **113,** 759-778.

438. Jacob (J. L.) et Sommers (S. C.). — The specificity of Formolized proteins. *Journ. of Immunol.*, 1939, **36,** 531-541.

439. Jacoby (M.). — Uber Ricin Immunität. *Beit. z. chem. Physiol. u. Path.*, 1902, **1,** 51-77.

440. Jacobs (J.). — On use of adsorbents in immunizations with haptens. *Journ. of Exptl. Med.*, 1934, **59,** 479-490.

441. Jarisch (A.). — Beiträge zur Pharmakologie der Lipoïde. — I : Versuche an roten Blutkörperchen. *Pflüg. Arch. f. d. ges. Physiol.*, 1921, **186,** 299.

442. Jarisch (A.). — Id. — II Mitteilung : Seife und Serum. *Ibid.*, 1922, **194,** 337-351.

443. Jeoffroy (R.). — Insuline et Aninsuline. Contribution à l'étude des propriétés de l'aninsuline. Thèse Doct. Méd. Vét., Alfort, 1945.

444. Johnson (L. R.) et Wormall (A.). — The immunological properties of alcali-treated proteins. *Biochem. Journ.*, 1932, **26,** 1202-1213.

445. Jordan-Lloyd (D.) et Phillips (H.). — Protein structure and protein hydratation. *Trans. Faradag Soc.*, 1933, **29,** 132-148.

446. Kabat (E. A.). — Immunochemistry of the proteins. *Journ. of Immunol.*, 1943, **47,** 513-587.

447. Kabat (E. A.) et Pedersen (K. O.). — The Molecular weight of antibodies. *Science*, 1938, **87,** 372.

448. Kabat (E. A.). — The Molecular weight of antibodies. *Journ. of Exptl. Med.*, 1939, **69,** 103-118.

450. Karady (S.). — Role of auto-antigens in the pathogenesis of physical allergy. *Journ. of Immunol.*, 1939, **37,** 457-461.

451. Karrer. — Cité par Polonovski [723].

452. Kass (E. H.). — The occurence of normal serum gammaglobulin in human lymphocytes. *Science*, 1945, **101,** 337-338.

453. Kass (E. H.), Sherago (M.) et Weaver (R. H.). — Effect of enzymic digestion upon antigenic properties of antitoxic and normal horse plasmas. *Journ. of Immunol.*, 1942, **45,** 87-103.

454. Kauder (G.). — Zur Kenntniss der Eiweisskörper des Blutserums. *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 1886, **20**, 411-425.

455. Kazal (L. A.), Falco (J. R. de) et Arnow (L. E.). — The antigenicity of alkali-treated bovin serum protein. *Journ. of Immunol.*, 1946, **54**, 245-251.

456. Kekwick (R. A.) et Cannan (R. K.). — The effect of formaldehyde on the hydrogen ion dissociation curve of egg albumin. *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 235-240.

457. Kekwick (R. A.) et Record (B. R.). — Some physical properties of diphteria antitoxic Horse sera. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1941, **22**, 29-44.

458. Kendall (F. E.). — Studies on serum proteins. — I : Identification of a single serum globulin by immunological means. Its distribution in the sera of normal individuals and of patients with cirrhosis of the liver and with chronic glomerulo-nephritis. *Journ. of Clin. Invest.*, 1937, **16**, 921-931.

— The use of immunochemical methods for the identification and determination of human serum proteins. *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.*, 1938, **6**, 376-384.

459. Kendall (F. E.). — Theory of the precipitin reaction. *Rept. Proc. Zrd. Intern. Congr. Microbiol.*, 1939, pp. 817-818.

460. Kimizura (K.). — Antigenic properties of Lipids. *Journ. Biochem.* (Tokio), 1935, **21**, 141-152.

461. Kirkbride (M. B.) et Cohen (S. M.). — Precipitation reaction of Meningococcus Strains with immune serum in agar plates in relation to antigen activity. *Am. Journ. of Hyg.*, 1934, **20**, 444-453.

462. Kleczkowski (A.). — Quantitative investigation of precipitin reactions of proteins treated with phenyl *iso* cyanate and Formaldehyde. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1940, **21**, 1-12.

463. Kleczkowski (A.). — Quantitative investigation of changes in antigen properties in the course of iodination of Horse serum globulin. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1940, **21**, 98-103.

464. Kleczkowski (A.). — Effect of heat on floculating antibodies of Rabbit antisera. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1941, **22**, 192-208.

465. Kodamar (R.). — Anaphylaxis produced by eye tissue. Primary toxicity of eye tissues. Organ specificity and group reactions of eye tissues. Anaphylactic theory of sympathetic ophtalmia. *Journ. of Inf. Diseases*, 1922, **30**, 418,432.

466. Koldaev (B. M.). — *Russ. Journ. Physiol.*, 1921, **3**, 139. D'après *Physiol. Abstr.*, 1922, **7**, 457.

467. Kowarski (A.). — Ueber den Nachweis von pflanzlichen

Eiweiss auf biologischem Wege. *Deuts. Med. Wschr.*, 1901, **27**, 442.

468. Kraus (R.). — Ueber specifische Niederschläge in Filtraten der Cholera-und Typhusculturen mit Cholera-und Typhusserum. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1897, **10**, 431.

469. Kraus (R.). — Ueber specifische Reactionen in keimfreien Filtraten aus Cholera Typhus und Pest bouillon-culturen, erzeugt durch homologes Serum. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1897, **10**, 736-738.

470. Kraus (R.), Dœrr (R.) et Sohma. — Ueber Anaphylaxie hervogerufen durch Organextrakte (Linsen). *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1908, **21**, 1084-1085.

471. Kraus (R.) et Levaditi (C.). — Sur l'origine des précipitines. *C. R. Acad. Sc.*, 1904, **138**, 865-867.

472. Kritschewski (I. L.) et Awrech (W. W.). — Ueber die Rolle des Mediums bei den Phänomenen der Immunität. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1929, **61**, 464-477.

473. Krumwiede (C.) et Banzhof (E. J.). — A new Method of adding cresol to antitoxins and antiserums. *Journ. of Inf. Diseases*, 1921, **28**, 367-373.

474 .Krumwiede (C.) et Noble (W. C.). — A note on the claim that agglutinins are lipoïdal in nature. *Journ. of Immunol.*, 1921, **6**, 201-204.

475. Kumagawa (M.) et Suto (K.). — Uber die Bestimmung des Fettgehaltes tierischer Flussigkeiten nach Pflüger-Dormeyer. *Beit. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 1904, **4**, 185-191.

476. Küntzel (A.). — *Z. Angew. Chem.*, 1937, **50**, 308.

477. Kurten (H.). — Untersuchungen über die Wirkungsweise von Formaldehyd auf Organkolloide. — I Mitteilung : Die Rolle des Formaldehyds bei der Aufhebung der Reactions fähigkeit luischer Seren. *Biochem. Zeitschr.*, 1922, **133**, 126.

478. Landsteiner (K.). — Ueber die Antigeneigenschaften von methylliertem Eiweiss. — VII : Mitteilung über Antigene. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1917, **26**, 122-133.

479. Landsteiner (K.). — Spezifische Serumreaktion mit einfach zusammengesetzten Substanzen von bekannter Konstitution (organischen Saüren). — XIV : Mitteilung über antigene und serologische Spezifizität. *Biochem. Zeitschr.*, 1920. **104**, 280-299.

480. Landsteiner (K.). — Serological reactivity of hydrolytic products from silk. *Journ. of Exptl. Med.*, 1942, **75**, 269-276.

481. Landsteiner (K.) et Barron (C.). — Ueber die Einwirkung von Saüre und Lauge auf Serum-eiweiss antigen. (Restitution der Antigeneigenschaft.) — IX : Mitteilung über Antigene. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1917, **26**, 142-153.

482. Landsteiner (K.) et Chase (M. W.). — Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. — IV : Anaphylaxis induced by picrylchloride and 2-4 dinitrochlorobenzene. *Journ. of Exptl. Med.*, 1937, **66**, 337-351. — VI : Experiments on the sensitization of guinea pig to poison ivy. *Ibid.*, 1939, **69**, 767-784. — VII : Skin sensitization by intraperitoneal injections. *Ibid.*, 1940, **71**, 237-245. — IX : Sensitization induced by injection of conjugates. *Ibid.*, 1941, **73**, 431-438.

483. Landsteiner (K.) et Disomma (A. A.). — Id. — V : Sensitization to diazomethane and mustard oil. *Ibid.*, 1938, **68**, 383-390. — VIII : Sensitization to picric acid; subsidiary agents and mode of sensitization. *Ibid.*, 1940, **72**, 361-366.

484. Landsteiner (K.) et Jablons (B.). — Ueber die Bildung von Antikörpern gegen verändertes arteigenes Serumeiweiss. — V : Mitteilung über Antigen. *Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig.*, 1913-1914, **20**, 618-621.

485. Landsteiner (K.) et Jablons (B.). — Ueber die Antigeneigenschaften von acetyliertem Eiweiss. — VI : Mitteilung über Antigene. *Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig.*, 1914, **21**, 193-201.

486. Landsteiner (K.) et Jacobs (J. L.). — II : Experiments on the immunization with haptens. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1932, **30**, 1413-1415.

487. Landsteiner (K.) et Jacobs (J. L.). — Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. — I : *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **61**, 643-656. — II : *Journ. of Exptl. Med.*, 1936, **64**, 625-639. — III : Anaphylaxis induced by arsphenamine. *Journ. of Exptl. Med.*, 1936, **64**, 717-721.

488. Landsteiner (K.) et Lampl (H.). — Ueber die Einwirkung von Formaldehyd auf Eiweissantigen. — VIII : Mitteilung über Antigene. *Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig.*, 1917, **26**, 133-141.

489. Landsteiner (K.). et Lampl (H.). — Ueber Antigen mit verschiedenartigen Acylgruppen. — X : Mitteilung über Antigene. *Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig.*, 1917, **26**, 258-276.

490. Landsteiner (K.) et Lampl (H.). — Ueber die Antigeneigenschaften von Azoproteine. — XII : Mitteilung über Antigene. *Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig.*, 1917, **26**, 293-304.

491. Landsteiner (K.) et Levine (P.). — A new agglutinable factor differenciating individual human bloods. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1926-1927, **24**, 600-602.

492. Landsteiner (K.) et Prasek (E.). — Ueber die Aufhebung der Artspezifizität von Serumeiweiss. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1913, **20**, 211-237.

493. Landsteiner (K.) et Scheer (J. Van den). — On the influence of acid groups on the serological specificity of azoproteins. *Journ. of Exptl. Med.*, 1927, **45**, 1045-1056.

494. Landsteiner (K.) et Scheer (J. Van den). — Serological differentiation of steric isomers. *Journ. of Exptl. Med.*, 1928, **48**, 315-320.

495. Landsteiner (K.) et Scheer (J. Van den). — Serological differentiation of steric isomers (antigens containing tartaric acids). *Journ. of Exptl. Med.*, 1929, **50**, 407-417.

496. Landsteiner (K.) et Scheer (J. Van den). — Serological réactions with simple chemical compounds (precipitin reactions). *Journ. of Exptl. Med.*, 1932, **52**, 399-409.

497. Landsteiner (K.) et Simms (J.). — Production of heterogenic compounds with mixtures of the binding part of the antigen and protein. *Journ. of Exptl. Med.*, 1923, **38**, 127.

498. Landsteiner (K.) et Welecki (S.). — Ueber den Einfluss konzentrierter Lösungen von Salzen und Nicht-electrolyten auf die Agglutination und Agglutininbildung. *Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig.*, 1911, **8**, 397-403.

499. Langstein (L.) et Mayer (M.). — Uber das Verhalten der Eiweisskörper des Blutplasmas bei experimentellen Infektionen. *Beit. z. chem. Physiol. u. Path.*, 1904, **5**, 69-82.

500. Latimer (W. M.) et Rodebush (W. H.). — Polarity and ionization from the stand point of the Lewis theory of valence. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1920, **42**, 1419-1433.

501. Leathes (J. B.). — On the role of fats in vital phenomena (Croonian Lecture). — I : Lancet, 1925, **208**, 803-807; II *Ibid.*, 853-856; III : *Ibid.*, 957-962; IV : *Ibid.*, 1019-1022.

502. Leblanc. — Cité par Bordet [1].

503. Lecomte du Noüy (P.). — Tension superficielle du sérum. Relation entre la chute en fonction du temps et les anticorps. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 1146-1148.

504. Lecomte du Noüy (P.). — Sur les variations de la viscosité du sérum sanguin en fonction de la température. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90**, 168-170.

505. Lecomte du Noüy (P.). — Modification physico-chimique momentanée du sérum, consécutive à l'injection d'antigène. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 14-15.

506. Lecomte du Noüy (P.). — Equilibres superficiels des solutions colloïdales. Etudes de Biophysique moléculaire. 1 vol., 1929. Masson et C^ie^, édit., Paris.

507. Lecomte du Noüy (P.) et Hamon (V.). — La viscosité des mélanges toxine-antitoxine diphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, **56**, 359-375.

508. Le Dantec (E.). — Les phénoménines ou l'unification du langage scientifique. *Biologica*, 1912, **2**, 225.

509. Ledingham (J. C. G.). — On the relation of the antitoxin to the globulin-content of the blood serum during diphteria immunisation. *Journ. of Hyg.*, 1907, **7**, 655-100.

510. Lefrou (G.) et Bonnet (P.). — L'équilibre protéidique du sérum des lépreux. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1934, **27**, 35-45.

511. Léger (M.) et Huchard (G. L.). — Sérums de syphilitiques et formol gélification. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 999-1000.

512. Levene (P. A.), Landsteiner (K.) et Scheer (J. Van den). — Immunization experiments with lecithin. *Journ. Exptl. Med.*, 1927 **46**, 197-204.

513. Lévy (M.), Mignon (S.) et Netter (A.). — Détermination des points iso-ioniques de l'hémoglobine et des protéines totales du sérum. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 1311-1324.

514. Lewis (J. H.). — Iso-antigenic properties of casein. *Journ. of Inf. Diseases*, 1934, **55**, 168-171.

515. Lewis (J. H.). — Effect of deamination on antigenic properties of casein. *Journ. of Inf. Diseases*, 1934, **55**, 203-206.

516. Lewis (J. H.). — Iso-antigenic properties of alcoholic extracts of brains. *Journ. of Immunol.*, 1941, **41**, 397-402.

517. Lewis (J. C.), Dimick (K. P.), Feustel (I. C.), Fevold (H. L.), Olcott (H. S.) et Fraenkel-Conrat (H.). — Modification of gramicidin through reaction with formaldehyde. *Science*, 1945, **102**, 274-275.

518. Lichtenstein (I.). — Zahl und Dissoziationsbereich der ionogenen Gruppen und die Dissoziationskurve der Eiweisskörper. I. *Biochem. Zeitschr.*, 1939-1940, **303**, 13-31.

519. Liebermann (C.). — Ueber das Oxychinoterpen. *Ber. d. Deuts. Chem. Ges.*, 1885, **185**, 1803-1809.

520. Liebermann (L.). — Notiz über das chemische Verhalten des Nierenparenchyms. *Pflüg. Archiv.*, 1891, **50**, 55-66.

521. Liesegang (R. E.). — *Naturwiss. Wchschr.*, 1896, **11**, 353.

522. Linderström-Lang (K.) et Schmidt (S.). — On the purification of Toxins and antitoxins. *C. R. Lab. Carlsberg*, 1930, **18**, n° 3, pp. 1-15.

523. Linossier (G.) et Lemoine (G. H.). — Sur les substances précipitantes des albumines (précipitines) contenues dans certains sérums spécifiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1902, **54**, 85-88.

524. Liu (S. C.), Chow (B. F.), Lee (K. H.). — Effect of immunization on the distribution of serum proteins. *Chinese Journ. of Physiol.*, 1937, **11**, 201-210.

525. Lloyd (R. B.) et Paul (S. N.). — Serum changes in Kalar-Azar. *Ind. Journ. Med. Res.*, 1928-1929, **16**, 203-219.
— Proteins graphs in Kalar-Azar, *Ibid.*, 1928-1929, **16**, 529-535.

526. Loiseleur (J.). — Formation de thio-dérivés protéiques à l'aide du sulfure de carbone. *C. R. Acad. Sc.*, 1935, **201**, 966-968.

527. Loiseleur (J.). — Sur les variations de la viscosité du sérum antivenimeux en présence de son antigène. *C. R. Acad. Sc.*, 1938, **207**, 186-189.

528. Loiseleur (J.). — Immunité artificielle et structure des protéines. *In* Réactivité des composés Biologiques. 1 vol., 1942. Hermann et C^ie^, édit., Paris.

529. Loiseleur (J.). — La dénaturation des protéides sous l'action secondaire du formol. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 435-436.

530. Loiseleur (J.) et Crovisier (C.). — Augmentation de la viscosité et de l'indice réfractométrique de l'eau soumise à l'action des rayons X. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 439-440.

531. Loiseleur (J.) et Crovisier (C.). — Influence de l'oxygène sur la radiosensibilité de la toxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 439-440.

532. Loiseleur (J.). — Mise en évidence de propriétés antigéniques des molécules organiques de faible poids moléculaire. *C. R. Acad. Sc.*, 1946, **222**, 461-462.

533. Loiseleur (J.). — Propriétés caractéristiques des anticorps formés par les molécules organiques de faible poids moléculaire. *C. R. Acad., Sc.*, 1946, **222**, 978-980.

534. Loiseleur (J.) [En collaboration]. — Techniques de Laboratoire. 1 vol., 1947. Masson et C^ie^, édit., Paris.

535. Loiseleur (J.) et Jacob (L.). — Sur les méthodes physiques mettant en évidence les anticorps formés par les molécules organiques de faible poids moléculaire. *C. R. Acad. Sc.*, 1946, **222**, 1013-1015.

536. Loiseleur (J.) et Lévy (M.). — La spécificité des anticorps consécutifs à l'injection directe de molécules organiques de faible poids moléculaire. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 116-140.

537. Loiseleur (J.), Lévy (M.) et Sureau (B.). — Sur les réactions sériques consécutives à l'administration de pénicilline. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 931-940.

538. Loiseleur (J.), Nitti (F.) et Faure (M.). — Relations entre la dénaturation et le pouvoir précipitant du sérum antidiphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1944, **70**, 321-331.

539. Loiseleur (J.), Pérez (J. J.) et Sergent (C.). — Renseignements fournis par les techniques de floculation et de viscosité sur la formation des anticorps. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 843-847.

540. Loiseleur (J.) et Prudhomme (R. O.). — Fluorescence des acides α-aminés consécutivement à l'action secondaire du formol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 244-247.

541. London (F.). — Theory and systematics of Molecular Forces,

Zeitschr. f. Physik., 1930, **63**, 245. (D'après *Chem. Abstc.*, 1930, **24**, 5597.)

542. Long (J. H.) et Gephart. — Observations on the stability of lecithin. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1908, **30**, 881-895.
— On the behavior of lecithin with Bile salts, and the occurence of Lecithin in Bile. *Ibid.*, 1908, **30**, 1312-1319.

543. Lourau (M.). — Electrophorèse des immunsérums. Modification du point isoélectrique des anticorps au cours de la sensibilisation. *Journ. Chim. Phys.*, 1941, **38**, 149-161.

544. Lourau (M.). — Sur la dégradation aseptique des anticorps hémolytiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 106-109.

545. Lourau (M.). — Sur le mécanisme de formation des agglutinines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 110-114.

546. Lowell (Fr. C.). — A comparison of the collodion particle technic with other methods of measuring antibodies. *Journ. of Immunol.*, 1943, **46**, 177-182.

547. Ludke (H.). — Uber Antikörperbildung in Kulturen lebenden Körperzellen. *Berl. Klin. Wochenschr.*, 1912, **49**, 1034-1035.

548. Luetscher (J. A. Jr.). — Biological and Medical applications of electrophoresis. *Physiol. Reviews*, 1947, **27**, 621-642.

549. Mc Farlane (A. S.). — An ultracentrifugal investigation of serum proteins. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 407-429.

550. Mc Farlane (A. S.). — The ultracentrifugal protein sedimentation diagram of normal Human, Cow and Horse serum. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 660-693.

551. Mc Farlane (A. S.). — The Behavior of pathological sera in the ultracentrifuge. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1175-1201.

552. Mc Farlane (A. S.). — The ultracentrifugal analysis of normal and pathological serum fractions. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1209-1226.

553. Machebœuf (M.). — Recherches sur les stérols, les lipides et les protéides du sérum et du plasma sanguins. Thèse Doct. ès Sciences, Paris, 1928.

554. Machebœuf (M.). — Le problème immunochimique des Bacilles acido-résistants et en particulier des Bacilles Tuberculeux. *In* Rapports du VI[e] Congrès de Chimie Biologique, Lyon, 1937, 1 vol., 1937. Masson et C[ie], édit., Paris.

555. Machebœuf (M.). — Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique, 1 vol., 1937. Hermann et C[ie], édit., Paris.

556. Machebœuf (M.). — Cours de chimie biologique, 2 vol., 1939. Centre de documentation Universitaire, Tournier et Constant, édit., Paris.

557. Machebœuf (M.). — Protéides du sérum sanguin; aperçus physico-chimiques sur les œdèmes. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1939, **1**, 204-219.

558. Machebœuf (M.). — L'électrophorèse différentielle des pro-

téides. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1944, **4**, 35-56.

559. Machebœuf (M.). — Les cénapses lipido-protéidiques. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1945, **5**, 71-104.

560. Machebœuf (M.). — Travaux récents sur la constitution chimique des anticorps. *Schweiz. Zeitschr. f. Path. u. Bakt.*, 1946, **9**, 466-504.

— Conceptions modernes sur la structure des anticorps. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1948, **8**, 245-278.

561. Machebœuf (M.) et Delsal (J. L.). — Recherches sur le dosage colorimétrique de petites quantités de cholestérol libre ou estérifié. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 296-309.

562. Machebœuf (M.) et Faure (M.). — Immunité et chimie. — I : Les antigènes. *Gaz. Méd. de France*, 1941, **48**, 273-283.

463. Machebœuf (M.) et Faure (M.). — Constitution chimique des anticorps. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1942, **3**, 134-161.

564. Machebœuf (M.) et Rebeyrotte (P.). — Action du déhydroabiétate de sodium sur le cholestérol et les lipides du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 475-477.

565. Machebœuf (M.) et Sandor (G.). — Recherches sur la nature et la stabilité des complexes protéides-lipides. Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther en présence d'alcool. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 1168-1190.

566. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Sur l'état des lipides et du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction de certaines cénapses lipido-protéidiques et libération de leurs substances lipoïdiques par un savon. *C. R. Acad. Sc.*, 1938, **206**, 860-862.

567. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Libération des lipides de certaines cénapses lipido-protéidiques du sérum sanguin par divers savons. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1181-1184.

568. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Méthode permettant de délipider, sans les dénaturer, les globulines du sérum sanguin. Application à l'étude du rôle des lipides dans le fractionnement des globulines en euglobulines et en pseudoglobulines. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1184-1186.

569. Machebœuf (M.)., Tayeau (F.) et Battut (V. M.). — Comparaison des diverses techniques de séparation et de dosage des globulines et de leurs fractions dans le sérum sanguin. Considérations sur les définitions des termes « globulines », « euglobulines » et « pseudoglobulines ». *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 481-484.

570. Machebœuf (M.) et Viscontini (M.). — Recherches sur la stabilité des liaisons entre agglutinines et bactéries. Cas du Bacille Typhi-Murium et des agglutinines spécifiques du

sérum de Lapin immunisé. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 495-496.

— Cas du Bacille Para-Typhique A et des agglutinines spécifiques du sérum de Cheval immunisé. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 555-556.

MACHEBŒUF (M.), VISCONTINI (M.) et RAYNAUD (M.). — Id. Essais infructueux de dissociation des complexes antigène-anticorps par des solutions d'amino-acides. *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, **69**, 376-378.

571. MACHEBŒUF (M.) et WAHL (R.). — Recherches biologiques sur la néphrose lipoïdique (IVe Mémoire). Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, **13**, 736-744.

572. Mc INNES (D. A.). — Theory of electrophoretic migration. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1939, **34**, 107-109.

573. Mc LEOD (C. M.) HODGES (R. G.), HEIDELBERGER (M.) et BERNHARD (W. G.). — Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *Journ. of Exptl., Med.*, 1945, **82**, 445-465.

574. Mc MASTER (P. D.) et HUDACK (S. S.). — The formation of agglutinins within lymph nodes. *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **61**, 783-805.

576. MADSEN (Th.) et SCHMIDT (S.). — Sur l'avidité du sérum antidiphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1926, **50**, 300-302.

577. MADSEN (Th.) et SCHMIDT (S.). — Floculation entre la toxine et l'anatoxine diphtérique, et standardisation de l'antitoxine. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, 882-884.

578. MADSEN (Th.) et STRENG (O.). — Einfluss der Temperatur auf den Zerfall der Antikörper (Agglutininen). *Zeitschr. f. Physikal. Chem.*, 1910, **70**, 263-276.

579. MADSEN (Th.) et WALBUM (L.). — Toxines et antitoxines. De la ricine et de l'antiricine. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1904, **26**, 242-256.

580. MAIER (H.). — Ueber die Reaktionsfähigkeit des synthetischen Lezithins und Ricinantisera. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1933, **78**, 1-21.

581. MALANGEAU (P.). — Emploi du méthylal au Laboratoire d'analyses biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 233-235.

582. MALKIEL (S.) et BOYD (W. C.). — The composition of specific precipitates in the region of antigen excess. *Journ. of Exptl. Med.*, 1937, **66**, 383-395.

583. MALONEY (P. J.) et WELD (C. B.). — Diphteria toxin-antitoxin flocculation (Ramon test). *Journ. Path. Bact.*, 1925, **28**, 655-672.

584. MANTEUFEL (P.) et TOMIOKA (Y.). — Ueber die Benutzung von Fleisch an Stelle von Serum als Antigen bei der Herstel-

lung von präzipitierenden Antiseren für die biologische Nährungsmitteluntersuchung. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol. Orig.*, 1924, **91**, 317-323.

585. Marcus (E.). — Ueber in Wasser lösliches Serumglobulin. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1899, **28**, 559-575.

586. Marie (A.). — Dosage de la cholestérine dans les sérums thérapeutiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 76-77.
— Recherches sur la cholestérine. II. *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, **38**, 945-951.

587. Marrack (J. R.). — *Rpt. Proc 3rd Cong. Intern. Microbiol.*, New-York, 1939, p. 87.

588. Marrack (J. R.) et Duff (D. A.). — Immunological behaviour of fractions of serum globulin. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1938, **19**, 171-178.

589. Marrack (J. R.) et Smith (F. C.). — The composition of Diphteria Toxin-Antitoxin Flocules. *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 1930, **106**, 1-19.

590. Marrack (J. R.) et Smith (F. C.). — Quantitative aspects of immunity reactions : the precipitin reaction. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1931, **12**, 30-35.

591. Marrack (J. R.) et Smith (F. C.). — Quantitative aspects of immunity reactions : the composition of the precipitate in precipitin reactions. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1931, **12**, 182-190.

592. Marrack (J. R.) et Smith (F. C.). — Quantitative aspects of immunity reactions : the combination of antibodies with simple haptenes. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1932, **13**, 394-402.

593. Martin (D. S.). — A simplified serum dilution procedure for the quantitative titration of precipitins in a pure antigen-antibody system. *Journ. of Bact.*, 1943, **45**, 71-72.

594. Martin (M.). — Recherches sur le fractionnement des protéides sériques. Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Bordeaux. 1944.

595. Mascré (M.) et Herbain (M.). — Influence du formol sur la précipitation des matières azotées des sérums par l'acide trichloracétique. *C. R. Acad. Sc.*, 1929, **189**, 876-878.

596. Mascré (M.) et Herbain (M.). — Nouvelles expériences sur la précipitation des matières azotées des sérums en présence de formol. *C. R. Acad. Sc.*, 1930, **190**, 1205-1207.

597. Mascré (M.) et Herbain (M.). — Influence du formol sur la précipitation des protéides sériques. *Bull. Soc. Chim., Biol.*, 1930, **12**, 978-993.

598. Mascré (M.) et Bouchara (E.). — Influence du formol sur la précipitation des matières albuminoïdes du lait. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 994-1000.

599. Masson (V. R.). — The relation of H-ion concentration to

508. Le Dantec (E.). — Les phénoménines ou l'unification du langage scientifique. *Biologica,* 1912, **2,** 225.

509. Ledingham (J. C. G.). — On the relation of the antitoxin to the globulin-content of the blood serum during diphteria immunisation. *Journ. of Hyg.,* 1907, **7,** 655-100.

510. Lefrou (G.) et Bonnet (P.). — L'équilibre protéidique du sérum des lépreux. *Bull. Soc. Path. Exot.,* 1934, **27,** 35-45.

511. Léger (M.) et Huchard (G. L.). — Sérums de syphilitiques et formol gélification. *C. R. Soc. Biol.,* 1922, **86,** 999-1000.

512. Levene (P. A.), Landsteiner (K.) et Scheer (J. Van den). — Immunization experiments with lecithin. *Journ. Exptl. Med.,* 1927 **46,** 197-204.

513. Lévy (M.), Mignon (S.) et Netter (A.). — Détermination des points iso-ioniques de l'hémoglobine et des protéines totales du sérum. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1936, **18,** 1311-1324.

514. Lewis (J. H.). — Iso-antigenic properties of casein. *Journ. of Inf. Diseases,* 1934, **55,** 168-171.

515. Lewis (J. H.). — Effect of deamination on antigenic properties of casein. *Journ. of Inf. Diseases,* 1934, **55,** 203-206.

516. Lewis (J. H.). — Iso-antigenic properties of alcoholic extracts of brains. *Journ. of Immunol.,* 1941, **41,** 397-402.

517. Lewis (J. C.), Dimick (K. P.), Feustel (I. C.), Fevold (H. L.), Olcott (H. S.) et Fraenkel-Conrat (H.). — Modification of gramicidin through reaction with formaldehyde. *Science,* 1945, **102,** 274-275.

518. Lichtenstein (I.). — Zahl und Dissoziationsbereich der ionogenen Gruppen und die Dissoziationskurve der Eiweisskörper. I. *Biochem. Zeitschr.,* 1939-1940, **303,** 13-31.

519. Liebermann (C.). — Ueber das Oxychinoterpen. *Ber. d. Deuts. Chem. Ges.,* 1885, **185,** 1803-1809.

520. Liebermann (L.). — Notiz über das chemische Verhalten des Nierenparenchyms. *Pflüg. Archiv.,* 1891, **50,** 55-66.

521. Liesegang (R. E.). — *Naturwiss. Wchschr.,* 1896, **11,** 353.

522. Linderström-Lang (K.) et Schmidt (S.). — On the purification of Toxins and antitoxins. *C. R. Lab. Carlsberg,* 1930, **18,** n° 3, pp. 1-15.

523. Linossier (G.) et Lemoine (G. H.). — Sur les substances précipitantes des albumines (précipitines) contenues dans certains sérums spécifiques. *C. R. Soc. Biol.,* 1902, **54,** 85-88.

524. Liu (S. C.), Chow (B. F.), Lee (K. H.). — Effect of immunization on the distribution of serum proteins. *Chinese Journ. of Physiol.,* 1937, **11,** 201-210.

525. Lloyd (R. B.) et Paul (S. N.). — Serum changes in Kalar-Azar. *Ind. Journ. Med. Res.,* 1928-1929, **16,** 203-219.

— Proteins graphs in Kalar-Azar, *Ibid.,* 1928-1929, **16,** 529-535.

526. Loiseleur (J.). — Formation de thio-dérivés protéiques à l'aide du sulfure de carbone. *C. R. Acad. Sc.*, 1935, **201**, 966-968.

527. Loiseleur (J.). — Sur les variations de la viscosité du sérum antivenimeux en présence de son antigène. *C. R. Acad. Sc.*, 1938, **207**, 186-189.

528. Loiseleur (J.). — Immunité artificielle et structure des protéines. *In* Réactivité des composés Biologiques. 1 vol., 1942. Hermann et C^ie^, édit., Paris.

529. Loiseleur (J.). — La dénaturation des protéides sous l'action secondaire du formol. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 435-436.

530. Loiseleur (J.) et Crovisier (C.). — Augmentation de la viscosité et de l'indice réfractométrique de l'eau soumise à l'action des rayons X. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 439-440.

531. Loiseleur (J.) et Crovisier (C.). — Influence de l'oxygène sur la radiosensibilité de la toxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 439-440.

532. Loiseleur (J.). — Mise en évidence de propriétés antigéniques des molécules organiques de faible poids moléculaire. *C. R. Acad. Sc.*, 1946, **222**, 461-462.

533. Loiseleur (J.). — Propriétés caractéristiques des anticorps formés par les molécules organiques de faible poids moléculaire. *C. R. Acad., Sc.*, 1946, **222**, 978-980.

534. Loiseleur (J.) [En collaboration]. — Techniques de Laboratoire. 1 vol., 1947. Masson et C^ie^, édit., Paris.

535. Loiseleur (J.) et Jacob (L.). — Sur les méthodes physiques mettant en évidence les anticorps formés par les molécules organiques de faible poids moléculaire. *C. R. Acad. Sc.*, 1946, **222**, 1013-1015.

536. Loiseleur (J.) et Lévy (M.). — La spécificité des anticorps consécutifs à l'injection directe de molécules organiques de faible poids moléculaire. *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 116-140.

537. Loiseleur (J.), Lévy (M.) et Sureau (B.). — Sur les réactions sériques consécutives à l'administration de pénicilline. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 931-940.

538. Loiseleur (J.), Nitti (F.) et Faure (M.). — Relations entre la dénaturation et le pouvoir précipitant du sérum antidiphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1944, **70**, 321-331.

539. Loiseleur (J.), Pérez (J. J.) et Sergent (C.). — Renseignements fournis par les techniques de floculation et de viscosité sur la formation des anticorps. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 843-847.

540. Loiseleur (J.) et Prudhomme (R. O.). — Fluorescence des acides α-aminés consécutivement à l'action secondaire du formol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 244-247.

541. London (F.). — Theory and systematics of Molecular Forces,

Zeitschr. f. Physik., 1930, **63**, 245. (D'après *Chem. Abstc.*, 1930, **24**, 5597.)

542. Long (J. H.) et Gephart. — Observations on the stability of lecithin. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1908, **30**, 881-895.
— On the behavior of lecithin with Bile salts, and the occurence of Lecithin in Bile. *Ibid.*, 1908, **30**, 1312-1319.

543. Lourau (M.). — Electrophorèse des immunsérums. Modification du point isoélectrique des anticorps au cours de la sensibilisation. *Journ. Chim. Phys.*, 1941, **38**, 149-161.

544. Lourau (M.). — Sur la dégradation aseptique des anticorps hémolytiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 106-109.

545. Lourau (M.). — Sur le mécanisme de formation des agglutinines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 110-114.

546. Lowell (Fr. C.). — A comparison of the collodion particle technic with other methods of measuring antibodies. *Journ. of Immunol.*, 1943, **46**, 177-182.

547. Ludke (H.). — Uber Antikörperbildung in Kulturen lebenden Körperzellen. *Berl. Klin. Wochenschr.*, 1912, **49**, 1034-1035.

548. Luetscher (J. A. Jr.). — Biological and Medical applications of electrophoresis. *Physiol. Reviews*, 1947, **27**, 621-642.

549. Mc Farlane (A. S.). — An ultracentrifugal investigation of serum proteins. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 407-429.

550. Mc Farlane (A. S.). — The ultracentrifugal protein sedimentation diagram of normal Human, Cow and Horse serum. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 660-693.

551. Mc Farlane (A. S.). — The Behavior of pathological sera in the ultracentrifuge. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1175-1201.

552. Mc Farlane (A. S.). — The ultracentrifugal analysis of normal and pathological serum fractions. *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1209-1226.

553. Machebœuf (M.). — Recherches sur les stérols, les lipides et les protéides du sérum et du plasma sanguins. Thèse Doct. ès Sciences, Paris, 1928.

554. Machebœuf (M.). — Le problème immunochimique des Bacilles acido-résistants et en particulier des Bacilles Tuberculeux. *In* Rapports du VI[e] Congrès de Chimie Biologique, Lyon, 1937, 1 vol., 1937. Masson et C[ie], édit., Paris.

555. Machebœuf (M.). — Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique, 1 vol., 1937. Hermann et C[ie], édit., Paris.

556. Machebœuf (M.). — Cours de chimie biologique, 2 vol., 1939. Centre de documentation Universitaire, Tournier et Constant, édit., Paris.

557. Machebœuf (M.). — Protéides du sérum sanguin; aperçus physico-chimiques sur les œdèmes. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1939, **1**, 204-219.

558. Machebœuf (M.). — L'électrophorèse différentielle des pro-

téides. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1944, **4**, 35-56.

559. Machebœuf (M.). — Les cénapses lipido-protéidiques. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1945, **5**, 71-104.

560. Machebœuf (M.). — Travaux récents sur la constitution chimique des anticorps. *Schweiz. Zeitschr. f. Path. u. Bakt.*, 1946, **9**, 466-504.

— Conceptions modernes sur la structure des anticorps. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1948, **8**, 245-278.

561. Machebœuf (M.) et Delsal (J. L.). — Recherches sur le dosage colorimétrique de petites quantités de cholestérol libre ou estérifié. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 296-309.

562. Machebœuf (M.) et Faure (M.). — Immunité et chimie. — I : Les antigènes. *Gaz. Méd. de France*, 1941, **48**, 273-283.

463. Machebœuf (M.) et Faure (M.). — Constitution chimique des anticorps. *In* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1942, **3**, 134-161.

564. Machebœuf (M.) et Rebeyrotte (P.). — Action du déhydroabiétate de sodium sur le cholestérol et les lipides du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 475-477.

565. Machebœuf (M.) et Sandor (G.). — Recherches sur la nature et la stabilité des complexes protéides-lipides. Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther en présence d'alcool. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 1168-1190.

566. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Sur l'état des lipides et du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction de certaines cénapses lipido-protéidiques et libération de leurs substances lipoïdiques par un savon. *C. R. Acad. Sc.*, 1938, **206**, 860-862.

567. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Libération des lipides de certaines cénapses lipido-protéidiques du sérum sanguin par divers savons. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1181-1184.

568. Machebœuf (M.) et Tayeau (F.). — Méthode permettant de délipider, sans les dénaturer, les globulines du sérum sanguin. Application à l'étude du rôle des lipides dans le fractionnement des globulines en euglobulines et en pseudoglobulines. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1184-1186.

569. Machebœuf (M.)., Tayeau (F.) et Battut (V. M.). — Comparaison des diverses techniques de séparation et de dosage des globulines et de leurs fractions dans le sérum sanguin. Considérations sur les définitions des termes « globulines », « euglobulines » et « pseudoglobulines ». *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 481-484.

570. Machebœuf (M.) et Viscontini (M.). — Recherches sur la stabilité des liaisons entre agglutinines et bactéries. Cas du Bacille Typhi-Murium et des agglutinines spécifiques du

sérum de Lapin immunisé. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 495-496.

— Cas du Bacille Para-Typhique A et des agglutinines spécifiques du sérum de Cheval immunisé. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 555-556.

MACHEBŒUF (M.), VISCONTINI (M.) et RAYNAUD (M.). — Id. Essais infructueux de dissociation des complexes antigène-anticorps par des solutions d'amino-acides. *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, **69**, 376-378.

571. MACHEBŒUF (M.) et WAHL (R.). — Recherches biologiques sur la néphrose lipoïdique (IV^e^ Mémoire). Etude de l'extraction des lipides du sérum sanguin par l'éther. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931, **13**, 736-744.

572. Mc INNES (D. A.). — Theory of electrophoretic migration. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1939, **34**, 107-109.

573. Mc LEOD (C. M.) HODGES (R. G.), HEIDELBERGER (M.) et BERNHARD (W. G.). — Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *Journ. of Exptl., Med.*, 1945, **82**, 445-465.

574. Mc MASTER (P. D.) et HUDACK (S. S.). — The formation of agglutinins within lymph nodes. *Journ. of Exptl. Med.*, 1935, **61**, 783-805.

576. MADSEN (Th.) et SCHMIDT (S.). — Sur l'avidité du sérum antidiphtérique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1926, **50**, 300-302.

577. MADSEN (Th.) et SCHMIDT (S.). — Floculation entre la toxine et l'anatoxine diphtérique, et standardisation de l'antitoxine. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102**, 882-884.

578. MADSEN (Th.) et STRENG (O.). — Einfluss der Temperatur auf den Zerfall der Antikörper (Agglutininen). *Zeitschr. f. Physikal. Chem.*, 1910, **70**, 263-276.

579. MADSEN (Th.) et WALBUM (L.). — Toxines et antitoxines. De la ricine et de l'antiricine. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1904, **26**, 242-256.

580. MAIER (H.). — Ueber die Reaktionsfähigkeit des synthetischen Lezithins und Ricinantisera. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1933, **78**, 1-21.

581. MALANGEAU (P.). — Emploi du méthylal au Laboratoire d'analyses biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 233-235.

582. MALKIEL (S.) et BOYD (W. C.). — The composition of specific precipitates in the region of antigen excess. *Journ. of Exptl. Med.*, 1937, **66**, 383-395.

583. MALONEY (P. J.) et WELD (C. B.). — Diphteria toxin-antitoxin flocculation (Ramon test). *Journ. Path. Bact.*, 1925, **28**, 655-672.

584. MANTEUFEL (P.) et TOMIOKA (Y.). — Ueber die Benutzung von Fleisch an Stelle von Serum als Antigen bei der Herstel-

lung von präzipitierenden Antiseren für die biologische Nährungsmitteluntersuchung. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol. Orig.*, 1924, **91**, 317-323.

585. Marcus (E.). — Ueber in Wasser lösliches Serumglobulin. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1899, **28**, 559-575.

586. Marie (A.). — Dosage de la cholestérine dans les sérums thérapeutiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 76-77.
— Recherches sur la cholestérine. II. *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, **38**, 945-951.

587. Marrack (J. R.). — *Rpt. Proc 3rd Cong. Intern. Microbiol.*, New-York, 1939, p. 87.

588. Marrack (J. R.) et Duff (D. A.). — Immunological behaviour of fractions of serum globulin. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1938, **19**, 171-178.

589. Marrack (J. R.) et Smith (F. C.). — The composition of Diphteria Toxin-Antitoxin Flocules. *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 1930, **106**, 1-19.

590. Marrack (J. R.) et Smith (F. C.). — Quantitative aspects of immunity reactions : the precipitin reaction. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1931, **12**, 30-35.

591. Marrack (J. R.) et Smith (F. C.). — Quantitative aspects of immunity reactions : the composition of the precipitate in precipitin reactions. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1931, **12**, 182-190.

592. Marrack (J. R.) et Smith (F. C.). — Quantitative aspects of immunity reactions : the combination of antibodies with simple haptenes. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1932, **13**, 394-402.

593. Martin (D. S.). — A simplified serum dilution procedure for the quantitative titration of precipitins in a pure antigen-antibody system. *Journ. of Bact.*, 1943, **45**, 71-72.

594. Martin (M.). — Recherches sur le fractionnement des protéides sériques. Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Bordeaux. 1944.

595. Mascré (M.) et Herbain (M.). — Influence du formol sur la précipitation des matières azotées des sérums par l'acide trichloracétique. *C. R. Acad. Sc.*, 1929, **189**, 876-878.

596. Mascré (M.) et Herbain (M.). — Nouvelles expériences sur la précipitation des matières azotées des sérums en présence de formol. *C. R. Acad. Sc.*, 1930, **190**, 1205-1207.

597. Mascré (M.) et Herbain (M.). — Influence du formol sur la précipitation des protéides sériques. *Bull. Soc. Chim., Biol.*, 1930, **12**, 978-993.

598. Mascré (M.) et Bouchara (E.). — Influence du formol sur la précipitation des matières albuminoïdes du lait. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 994-1000.

599. Masson (V. R.). — The relation of H-ion concentration to

specific precipitation. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 1922, **33**, 116-117.

600. Mayer (M.) et Heidelberger (M.). — Velocity of combination of antibody with specific polysaccharides of pneumococcus. *Journ. of Biol. Chem.*, 1942, **143**, 567-574.

601. Medveczky (A.) et Uhrovits (A.). — Immunitätsforschungen mit benzoylierten Antigenen. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1931, **72**, 256-281.

602. Mellanby (J.). — Diphteria antitoxin. *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 1908, **80**, 399-413.

603. Merrill (M. H.) et Fleisher (M. S.). — Factors involved in the use of organic solvants as precipitating and drying agents of immune sera. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1932, **16**, 243-256.

604. Metalnikoff (S.). — Etudes sur la spermotoxine. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, **13**, 577-589.

605. Metalnikoff (S.) et Chorine (V.). — Rôle des réflexes conditionnels dans l'immunité. 1926, **40**, 893-900.

606. Metchnikoff (E.). — Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. 1 vol., 1901. Masson, édit., Paris.

607. Michaelis (L.). — Ueber Hemmungen der Präcipitinreaktion. *Beitr. z. chem. Phys. u. Path.*, 1906, **4**, 59-78.

608. Michaelis (L.) et Davidsohn (H.). — Die Abhängigkeit spezifischer Fällungsreaktionen von der Wasserstoffionen Konzentration. *Biochem. Zeitschr.*, 1912, **47**, 59-72.

609. Michaelis (L.) et Fleischmann (P.). — Ueber Bindungsverhältnisse zwischen Praecipitin und praecipitabler Substanz. *Zeitschr. f. Exptl. Path. u. Therap.*, 1905, **1**, 547.

610. Michailov (V.). — A new method of separating globulins and albumins. *Journ. f. fiz. Chim. obsh., St-Petersb.*, 1885, **17**, 348-358. D'après *Index Medicus*, 1885, **7**, 475.

611. Miescher (F.). — *Mediz. Chem. Untersuch. a. d. Labor. f. Angew. Chem. zu Tübingen*, 1871, **4**, 441.

612. Miessner (H.). — Die Beschälsenche. *Berl. Tierärztl. Wochschr.*, 1909, **25**, 634-636.

613. Miles (A. A.). — Optimal proportions in agglutination : with reference to the antigenic analysis of the *Brucella* group of organisms. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1933, **14**, 43-56.

614. Modern (F.) et Ruff (G.). — Etude physico-chimique de la désintégration protéolytique du sérum antidiphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 851-854.

615. Modern (F.). et Ruff (G.). — *Revue Soc. Argent. Biol.*, 1939, **15**, 108.

616. Mœrch (J. R.). — La réaction de Ramon. Propriétés floculantes de la toxine et de l'antitoxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 545-548.

617. Mœrch (J. R.). — Le principe floculant du sérum antidiphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108,** 562-565.

618. Moll (L.). — Ueber künstliche Umwandlung von Albumin in Globulin. *Beit. z. chem. Physiol. u. Path.*, 1904, **4,** 563-577.

619. Moreschi (C.). — Zur Lehre von den Antikomplementen. *Berlin Klin. Wochenschr.*, 1905, **42,** 1181-1185.

620. Morgan (W. T. J.). — Studies on Immunichemistry. — II : The isolation and properties of a specific antigenic substance from *B. Dysenteriæ* (Shiga). *Biochem. Journ.*, 1937, **31,** 2003-2021.

621. Morgan (W. T. J.) et Partridge (S. M.). — Bacterial antigens. *Nature*, 1939, **143,** 1025-1026.

622. Morgan (W. T. J.). — Isolierung von d. Galaktose und l. Rhamnose aus dem Hydrolysat des spezifischen Polysaccharids von Bact. Dysenteriae (Shiga). *Helvet. Chim. Act.*, 1938, **21,** 469-477.

623. Morris (M. C.) et Karr (H. V.). — Studies on the reversibility of the antigen-antibody reaction. *Journ. of Immunol.*, 1946, **54,** 315-324.

624. Mudd (S.). — A hypothetical Mechanism of antibody formation. *Journ. of Immunol.*, 1932, **23,** 423-427.

625. Mudd (S.) et Joffe (E. W.). — The Modification of antibodies by Formaldehyde. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1933, **16,** 947-960.

626. Muir (R.) et Browniwg (C. H.). — On the action of complement as agglutinin. *Journ. of Hyg.*, 1906, p. 20.

627. Murdick (P. P.) et Cohen (S. M.). — A note on the concentration and purification of antipneumococcus serum. *Journ. of Immunol.*, 1935, **28,** 205-208.

628. Mutermilch (S.). — L'immunisation active de la cavité méningée. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95,** 945-947.

629. Mutermilch (S.). — Formation locale des antitoxines dans le liquide céphalo-rachidien. *C. R. Acad. Sc.*, 1929, **188,** 205-206.

630. Mutsaars (W.). — Obtention d'immunsérum par injection de cholestérol adsorbé sur du kaolin. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120,** 263-266.

631. Mutsaars (W.). — Contribution à l'étude sérologique des xantho-protéines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62,** 81-120.

632. Mutsaars (W.) et Alexander (J.). — Caractère antigénique des protéines chauffées en milieu saccharosé. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121,** 898-899.

633. Mutsaars (W.) et Grégoire (P. E.). — Comparaison entre les caractères antigéniques des matières protéiques conjuguées à des noyaux aromatiques par des liaisons uréide ou azoïque. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123,** 144-148.

634. Mutzenbecher (P. Von). — Untersuchung der bei Serum-electrodialyse auftretenden Eiweissfraktionen mit der Ultrazentrifuge. *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **235**, 425-437.
— Die Analyse des Serums mit der Ultrazentrifuge. *Ibid.*, 1933, **266**, 226-249.
— Die Fraktionen des Serums. *Ibid.*, 1933, **266**, 250-258.
— Dissoziationen und Assoziationen der Serummoleküle. *Ibid.*, 1933, **266**, 259-265.

635. Napier (E.). — A new test for Kala-Azar. *The Ind. Med. Gaz.*, 1921, **56**, 338.
— A new serum test for Kala-Azar. *The Ind. Journ. of Med. Res.*, 1921-1922, **9**, 830-846.
— Further practical experience with aldehyde test. *The Ind. Med. Gaz.*, 1923, **58**, 104.

636. Napier (E.). — A new Serological test for Kala-Azar. *The Ind. Med. Gaz.*, 1927, **62**, 362-365.

637. Neisser (M.) et Sachs (H.). — Ein Verfahren zum forensischen Nachweiss der Herfunkt des Blutes. *Berlin. Klin. Wochenschr.*, 1905, **42**, 1388-1389.

638. Nelis (P.) et Picard (E.). — L'anatoxine exerce-t-elle une action sur le rein de Lapin ? *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109**, 980-981.

639. Nellenstein (Cité par Garner [W. E.]). — Adsorption on solids with special reference to molecular orientation. *Trans. Faraday Soc.*, 1926, **22**, 459.

640. Nelis (P.). — La production des agglutinines spécifiques dans le sang et dans le liquide céphalorachidien des Lapins soumis à une inoculation intraveineuse de Bacilles parathyphiques B. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 172-174.

641. Neuberger (A.). — The reaction between histidine and HCHO. *Biochem. Journ.*, 1944, **38**, 309-314.

642. Neuberger (A.) et Yuill (M. E.). — A note on the possible relationship of the carbohydrate component of proteins to their antigenic properties. *Biochem. Journ.*, 1940, **34**, 109-111.

643. Neurath (H.). — The apparent shape of Protein Molecules. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 1841-1844.

644. Neurath (H.). — The investigation of proteins by diffusion measurements. *Chem. Reviews*, 1942, **30**, 357-394.

645. Neurath (H.), Greenstein (J. P.), Putnam (F. W.) et Erickson (J. O.). — The chemistry of Protein denaturation. *Chem. Reviews*, 1944, **34**, 157-265.

646. Neuzil (E.) et Pautrizel (R.). — Action comparée du formol sur l'antigène et sur l'anticorps dans la réaction sérum de Cheval-antisérum de Lapin. Etude de la zone d'équivalenve. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 186-188.

647. Neuzil (E.) et Pautrizel (R.). — Action comparée du formol sur l'antigène et sur l'anticorps dans la réaction sérum de Cheval-antisérum de Lapin. Influence des proportions variables d'antigène et d'anticorps. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 188-191.

648. Nicolas (E.). — Sur la gélification des sérums par l'aldéhyde formique. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 11-13.

649. Nicolas (E.) et Katrandjeff (K.). — Sur l'obtention de sérums précipitants à partir des protides coagulés par la chaleur. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 1310-1311.

650. Nicolas (E.) et Panisset (L.). — Action du formol sur les propriétés du sérum hémolytique. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 66-67.

651. Nicolle (Ch.). — Recherches sur la substance agglutinée. *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, **12**, 161-191.

652. Nicolle (M.). — Antigènes et anticorps, 1 vol., 1920. Masson et C^ie^, édit., Paris.

653. Nicolle (M.), Cesari (E.) et Debains (E.). — Précipitation mutuelle des toxines et des antitoxines. Application au titrage des sérums antidiphtérique et antitétanique. *C. R. Acad. Sc.*, 1919, **169**, 1433-1434.

— Etudes sur la précipitation mutuelle des anticorps et des antigènes. Premier Mémoire. Sérums « antisérums ». *Ann. Inst. Pasteur*, 1920, **34**, 149-152.

654. Nicolle (Ch.) et Ducloux (E.). — Technique de la ponction cardiaque chez le Lapin. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, **55**, 904-906.

— Applications de la ponction cardiaque chez le Lapin. Sa supériorité sur les autres méthodes de prélèvement du sang chez cet animal. *Ibid.*, 1903, **55**, 906-907.

655. Nicolle (M.) et Pozerski (E.). — Hypersensibilité au suc pancréatique inactif. *C. R. Soc. Biol.*, 1910, **68**, 1113-1114.

656. Nissen (F.). — Zur Kenntnis der backterienvernichtende Eigenschaft des Blutes. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh.*, 1889, **6**, 487-520.

657. Norris (C.). — The bacterial precipitins. *Journ. of Inf. Diseases*, 1904, **1**, 463-515.

658. Northrop (J. H.). — Purification of diphteria antitoxin. *Science*, 1941, **93**, 92.

659. Northrop (J. H.). — Purification and crystallization of Diphteria antitoxin. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1942, **25**, 465-485.

660. Nungester (W. J.) et Lewis (S. R.). — Application of « falling drop » measurement of density to quantitative determination of antibody in immunological reactions. *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, 1941, **48**, 425-427.

661. Nuttal (G.). — Experimente über die bacterienfeindlichen

Einflüsse des tierischen Körpers. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh.*, 1888, **4**, 353-394.

662. Nuttal (G.). — Blood Immunity and Blood relationship, 1 vol., 1904.

663. Obermayer (F.) et Pick (E. P.). — Séance du 22 mai 1903 de la « K. K. Gesellschaft der Aertze in Wien ».

664. Obermayer (F.) et Pick (E. P.). — Beiträge zur Kenntnis der Präzipitinbildung. Ueber den Begriff der Art- und Zustandsspezifizität (originäre und konstitutive Gruppierung) und die Beeinflussung der chemischen Eigenart des Tierkörpers. *Wien. Klin. Wochschr.*, 1904, **17**, 265-267.

665. Obermayer (F.) et Willheim (R.). — Ueber formotitrimetrische Untersuchungen an Eiweisskörpern. I. Mitteilung. *Biochem. Zeitschr.*, 1912, **38**, 331-343.

666. Ogston (A. G.). — Some observations on Mixtures of serum albumin and Globulin. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 1952-1957.

667. Olitzki (L.) et Franckel (M.). — Absorption and elution of antibodies from various antisera. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1931, **28**, 492-494.

668. Opie (E. L.). — The relation of antigen to antibody (precipitin) in vitro. *Journ. of Immunol.*, 1923, **8**, 19-34.

669. Ornstein (F.). — Ueber des Antigene Vermögen der Lipoide. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1926, **39**, 785.

670. Osborn (T. W. B.). — Complement or alexine. 1 vol., 1939. University of the Witwatersrand. Johannesburg; Oxford University Press. H. Mitford, édit., London.

671. Oudin (J.). — La représentation graphique de la réaction de précipitation spécifique. Etude théorique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, **27**, 254-259.

672. Oudin (J.). — L'analyse immunochimique du sérum de Cheval par précipitation spécifique en milieu gélifié. Premiers résultats. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 140-149.

673. Oudin (J.). — Communication personnelle.

674. Pagniez (Ph.) et Koang (N. K.). — Suppression, par action de l'éther, de certaines propriétés hymolysantes et toxiques de certains sérums. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 786-788.

675. Païc (M.). — Dosage précis des anticorps précipitants et de leurs antigènes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 534-539.

676. Panisset (L.) et Verge (J.). — La formolgélification des sérums des Bovidés tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **87**, 667-669.

677. Panum (P. Von). — Ueber einen konstanten mit dem Kasein übereistimmenden Bestandteil des Blutes. *Virchows Archiv.*, 1851, **3**, 251-264.

678. Pappenheimer (A. M. Jr.). — Diphteria toxin. — II : The

Action of ketene and formaldehyde. *Journ. of Biol. Chem.*, 1938, **125**, 201-208.

679. Pappenheimer (A. M. Jr.). — Anti-egg albumin antibody in the Horse. *Journ. of Exptl. Med.*, 1940, **71**, 263-269.

680. Pappenheimer (A. M. Jr.) et Enders (J. F.). — Specific Carbohydrate of type I Pneumococcus. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1933, **31**, 37.

681. Pappenheimer (A. M. Jr.), Lundgren (H. P.) et Williams (J. W.). — Studies on the molecular weight of diphteria toxin, antitoxin and their reaction products. *Journ. of Exptl. Med.*, 1940, **71**, 247-262.

682. Pappenheimer (A. M. Jr.) et Robinson (E. S.). — A quantitative study of the Ramon diphteria flocculation reaction. *Journ. of Immunol.*, 1937, **32**, 291-300.

683. Parfentjev (I. A.). — Purifing Antitoxins. *U. S. Pat.* 2.065.196 (22-12-1935).

684. Parnas (J. K.) et Wagner (R.). — Ueber die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldahl. *Biochem. Zeitschr.*, 1921, **125**, 253-256.

685. Pauling (L.). — A theory of structure and process of formation of antibodies. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 2640-2657.

686. Pauling (L.). — The Natur of the Chemical Bond. 1 vol., 1940. Cornell University Press, Ithaca.

687. Pauling (L.). — Analogies between antibodies and Simpler Chemical substances. *Chem. Eng. News*, 1946, **24**, 1064-1065.

688. Pauling (L.). — Molecular Structure and Biological Specificity. Conférence au XI[e] Congrès International de Chimie pure et appliquée, Londres, 17 juillet 1947.

689. Pauling (L.) et Campbell (D. H.). — The production of antibodies in vitro. *Science*, 1942, **95**, 440-441.

690. Pauling (L.) et Campbell (D. H.). — The manufacture of antibodies in vitro. *Journ. of Exptl. Med.*, 1942, **76**, 211-220.

691. Pauling (L.), Campbell (D. H.) et Pressmann (D.). — Complement fixation with simple haptens containing two or more haptenic groups. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1942, **28**, 77-79.

692. Pauling (L.), Campbell (D. H.) et Pressmann (D.). — The nature of the forces between antigen and antibody and the precipitation reaction. *Physiol. Reviews*, 1943, **23**, 203-219.

693. Pauling (L.) et Pressmann (D.). — The serological properties of simple substances. — IX : Hapten inhibition of Precipitation of antisera homologous to the o —, m — and p — azophenylarsonic acid group. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 1003-1012.

694. Pauling (L.), Pressmann (D.) et Campbell (D. H.). — The Serological properties of simple substances. — VI : The

precipitation of a mixture of two specific antisera by a dihaptenic substance containing the two corresponding haptenic groups; evidence for the framework theory of serological reactions. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 330-336.

695. Pauling (L.), Pressmann (D.), Campbell (D.), Ikeda (C.) et Ikawa (M.). — The Serological properties of simple substances. — I : Precipitation reactions between antibodies and substances containing two or more haptenic groups. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1942, **64**, 2994-3003.

696. Pauling (L.), Pressmann (D.), Grossberg (A. L.). — The Serological properties of simple substances. — VII : A quantitative theory of the precipitation of heterologous antisera with antigens, and comparison with experimental results for Polyhaptenic simple substances and for azoproteins. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 784-792.

697. Pauling (L.), Pressmann (D.) et Ikeda (C.). — The Serological properties of simple substances. — III : The composition of precipitates of antibody and polyhaptenic simple substances; the valence of antibodies. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1942, **64**, 3010-3014.

698. Pauling (L.), Pressmann (D.), Ikeda (C.) et Campbell (D.). — The serological properties of simple substances. — II : The effect of changed conditions and of added haptens on precipitation of polyhaptenic simple substances. *Journ. Am. Chem., Soc.*, 1942, **64**, 3003-3009.

699. Pauly (H.). — Uber die Konstitution des Histidins. I Mitteilung. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1904, **42**, 508-518.

— Zur Kenntniss der Diazoreaktionen des Eiweisses. *Ibid.*, 1915, **94**, 284-290.

700. Pautrizel (R.) et Tayeau (F.). — Le monobromacétate de sodium dans la réaction sérum de Cheval-antisérum de Lapin. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, sous presse.

701. Pérez (J. J.). — Les réactions de précipitation spécifique; *in* Loiseleur (J.) [534], Chap. VII, pp. 642-645.

702. Pérez (J. J.), Grabar (P.) et Loiseleur (J.). — Propriétés immunologiques des protéides après solubilisation dans des milieux non aqueux. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 430-432.

703. Pérez (J. J.) et Sergent (C.). — Action des ultra-sons sur le pouvoir précipitant spécifique des pseudoglobulines. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 415-416.

704. Perlzweig (W. A.) et Keefer. — The immunizing antigen of the pneumococcus. — III : The purification of the water soluble antigen. *Journ. of Exptl. Med.*, 1925, **42**, 747-752.

705. Perlzweig (W. A.) et Steffen (G. I.). — Studies on pneumococcus immunity. — III : The nature of pneumococcus antigen. *Journ. of Exptl. Med.*, 1923, **38,** 163-182.

706. Perutz (M.). — X-Ray analysis of Hæmoglobin. *Nature*, 1942, **149,** 491-494; *Ibid.*, 1943, **151,** 714-716.

707. Petermann (M. L.). — The action of papain on beef-serum pseudoglobulin and on diphteria antitoxin. *Journ. of Biol. Chem.*, 1942, **144,** 607-616.

— The Splitting of Human Gamma Globulin Antibodies by Papain and Bromelin. *Journ. Am. Chem., Soc.*, 1946, **68,** 106-113.

708. Petermann (M. L.) et Pappenheimer (A. M. Jr.). — The ultracentrifugal analysis of Diphteria proteins. *Journ. of Phys. Chem.*, 1941, **45,** 1-19.

709. Petrie (G. F.). — A specific precipitation reaction associated with the growth in agar plates of Meningococcus, Pneumococcus and *B. Dysenteriæ* (Shiga). *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1932, **13,** 380-394.

710. Pfeiffer (R.). — Weitere Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität und über spezifische baktericide Process. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrank.*, 1894, **18,** 1-16.

711. Pfeiffer (R.) et Marx. — Die Bildungsstätte der Choleraschutzstoffe. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infectionskrankl.*, 1898, **27,** 272-297.

712. Picado (C.). — Propriétés antigéniques différentes des sérums d'animaux jeunes et des sérums d'animaux âgés. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **102,** 631-633.

— Vaccination contre la sénescence précoce. 1 vol., 1937. Le François, édit., Paris.

713. Pick (E. P.). — Zur Kenntnis der Immunkörper. Erste Mitteilung : Versuche zur Isolierung von Immunkörper des Blutserums. *Beit. Chem. Physiol. Path.*, 1902, **1,** 351-392.

— Zweite Mitteilung : über die bei der Agglutination und der spezifischen Niederschlagsbildung (Krauss) beteiligten Substanzen. *Beit. Chem. Physiol. Path.*, 1902, **1,** 393-444.

714. Pictet (A.) et Spengler (T.). — Ueber die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyläthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. *Ber. d. Deutsch. Chem. Ges.*, 1911, **44,** 2030-2036.

715. Piettre (M.). — Biochimie des protéines. Des protéines humorales au protoplasma par la méthode à l'acétone aux basses températures. 1 vol., 1937. Baillière, édit., Paris.

716. Piettre (M.) et Vila (A.). — Sur la séparation des protéines du sérum. *C. R. Acad. Sc.*, 1920, **170,** 1466-1468.

— Séparation des protéines du sérum. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921, **3,** 483-489.

717. Pillemer (L.), Ecker (E. E.) et Martiensen (E. W.). — The specificity of keratine derivatives. *Journ. Exptl. Med.*, 1939, **70**, 387-397.

718. Pirie (N. W.) et Pinhey (K. G.). — The titration curve of Glutathion. *Journ. of Biol. Chem.*, 1929, **84**, 321-333.

719. Plaut (F.) et Rudy (H.). — Immunisierungsversuche mit Lezithin aus Menschenhirn. *Zeitschr. f.- Immunitätsf.*, 1931-1932, **73**, 385-391.

720. Plaut (F.) et Rudy (H.). — Ueber Immunisierungen mit adsorbierten Haptenen insbesondere mit Hirnhapten, ohne artfremdes Eiweiss. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1933, **81**, 87-100.

721. Pohl (J.). — Ein neues Verfahren zur Bestimmung des Globulins im Harn und in serösen Flussigkeiten. *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 1886, **20**, 426-438.

722. Polishuk (Z.) et Gurevitch (J.). — Enhaucement of Immune antibodies by Human serum. *Nature*, 1946, **158**, 589-590.

723. Polonovski (M.), Boulanger (P.), Machebœuf (M.), Roche (J.) et Sannie (C.). — Biochimie Médicale. 1 vol., 1947. Masson et C^ie^, édit., Paris.

724. Polonovski (J.), Faure (M.) et Machebœuf (M.). — Délipidation des anticorps et zone de floculation. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 67-72.

725. Pons (R.). — Affinités comparées de l'antitoxine diphtérique pour la toxine et l'anatoxine diphtériques. *Revue d'Immunol.*, 1939, **5**, 557-562.

726. Pons (R.). — Mode d'action du formol sur les anticorps. Cas particulier du sérum antitétanique. *Ann. Int. Pasteur*, 1941, **67**, 383-387.

727. Pons (R.). — Sur une propriété curieuse des mélanges toxine-anatoxine diphtériques. *Ann. Inst. Pasteur.*, 1942, **68**, 90-92.

728. Pope (C. G.). — Disaggregation of proteins by enzymes. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1938, **19**, 245-251.

729. Pope (C. G.). — The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in antisera. — I : True digestion of proteins. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1939, **20**, 132-149.
— II : Heat denaturation after partial enzymes action. *Ibid.*, 1939, **20**, 201-212.

730. Pope (C. G.) et Healey (M.). — A photoelectric study of reaction between diphteria toxin and antitoxin. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1938, **19**, 397-410.

731. Pope (C. G.) et Healey (M.). — The preparation of diphteria antitoxin in a state of high purity. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1939, **20**, 213-216.

732. Porges (O.) et Neubauer (E.). — Physikalisch-Chemische Untersuchungen über das Lezithin und Cholesterin. *Biochem., Zeitschr.*, 1908, **7**, 152-177.

733. Porges (O.) et Spiro (K.). — Die Globuline des Blutserums. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, 1903, **3**, 277-285.

734. Porter (E. F.) et Pappenheimer (A. M. Jr.). — Antigen-Antibody reactions between layers adsorbed on built-up stearate films. *Journ. of Exptl. Med.*, 1939, **69**, 755-765.

735. Pregl (F.). — Die Quantitative organische Mikroanalyse. 1 vol., 1935, 4e édit., J. Springer édit., Berlin.

736. Pressmann (D.), Brown (D. H.) et Pauling (L.). — The Serological properties of simple substances. — IV : Hapten Inhibition of precipitation of antibodies and polyhaptenic simple substances. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1942, **64**, 3015-3020.

737. Pressmann (D.), Bryden (J. H.) et Pauling (L.). — The Serological properties of simple substances. — X : A Hapten Inhibition experiment substantiating the intrinsic molecular asymmetry of antibodies. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 1219-1222.

738. Pressmann (D.), Grossberg (A. L.), Pence (L. H.) et Pauling (L.). — The Serological properties of simple substances. — XII : Reactions of antiserum homologous to p-azophenyl-trimethylammonium group. *Journ. Am. Chem., Soc.*, 1946, **68**, 250-255.

739. Pressmann (D.), Maynard (J. T.), Grossberg (A. L.) et Pauling (L.). — The Serological properties of simple substances. — V : The precipitation of polyhaptenic simple substances and antiserum homologous to the p-(p-azophenyl-azo)-phenylarsonic acid group and its inhibition by haptens. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 728-732.

740. Pressmann (D.), Pardec (A. B.) et Pauling (L.). — The Serological properties of simple substances. — XI : The reactions of antisera homologous to various azophenylarsonic acid groups and the p-azophenyl methylarsinic group in some heterologous haptens. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 1602-1606.

741. Pressmann (D.), Swingle (S. M.), Grossberg (A. L.) et Pauling (L.). — The Serological properties of simple substances. — VIII : The reactions of antiserum homologous to p-azobenzoic acid group. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 1731-1738.

742. Przesmycki (F.) et Szczuka (S.). — Recherches sur la thermoprécipitation d'Ascoli. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 1478-1479.

743. Przygode (P.). — Uber die Bildung spezifischer Präcipitine in künstlichen Gewebskulturen. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1914, **27**, 201-204.

744. Quinan (C.). — Uber spezifische Erythrolyse. *Beitr. z. chem. Physiol. u. Path.*, 1904, **5**, 95-100.

745. Ramon (G.). — Floculation dans un mélange neutre de toxine-antitoxine diphtériques. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 661-663.
746. Ramon (G.). — Sur une technique de titrage *in vitro* du sérum antidiphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 711-712.
747. Ramon (G.). — A propos du titrage *in vitro* du sérum antidiphtérique par la floculation. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 813-815.
748. Ramon (G.). — Sur la concentration du sérum antidiphtérique et l'isolement de l'antitoxine. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 167-168.
749. Ramon (G.). — Pouvoir floculant et pouvoir toxique de la toxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 2-4.
750. Ramon (G.). — La floculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphtériques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1923, **37**, 1001-1011.
751. Ramon (G.). — Sur le pouvoir floculant et les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue anatoxique (anatoxine). *C. R. Acad. Sc.*, 1923, **177**, 1338-1340.
752. Ramon (G.). — Sur les propriétés de l'anatoxine diphtérique. *C. R. Acad. Sc.*, 1924, **179**, 422-425.
753. Ramon (G.). — Sur l'anatoxine diphtérique et les anatoxines en général. *Ann. Inst. Pasteur*, 1925, **39**, 1-21.
754. Ramon (G.). — Sur un procédé d'immunisation antitoxique et de production des antitoxines. *Bull. Soc. Centr. Méd. Vét.*, 1925, **101**, 348.
755. Ramon (G.). — Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les Chevaux producteurs de sérum antidiphtérique. *Bull. Soc. Centr. Méd. Vét.*, 1925, **101**, 227-234.
756. Ramon (G.). — Procédés pour accroître la production des antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1926, **40**, 1-10.
757. Ramon (G.). — Sur la spécificité et la signification du phénomène de floculation dans les mélanges toxine-antitoxine diphtériques. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 538-540.
758. Ramon (G.). — A propos de la vitesse de floculation du sérum antidiphtérique vis-à-vis de la toxine spécifique. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 635-637.
759. Ramon (G.). — Sur la stabilité des propriétés de l'anatoxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 1504-1506.
760. Ramon (G.). — Sur la vitesse d'apparition des anticorps. *C. R. Biol.*, 1928, **99**, 1295-1297.
761. Ramon (G.). — L'anatoxine diphtérique. Ses propriétés. Ses applications. *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, **42**, 959-1009.
762. Ramon (G.). — Sur l'affinité de l'antitoxine diphtérique pour l'antigène spécifique (toxine ou anatoxine). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 31-33.
763. Ramon (G.), Descombey (P.) et Bilal (S.). — Essais sur l'immunité antitoxique. L'antigène injecté dans la cavité

rachidienne provoque-t-il la formation locale d'antitoxine ? *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 361-364.

764. Ramon (G.). — L'anatoxine diphtérique et la prophylaxie de la diphtérie. *Ann. de Méd.*, 1937, **42**, 314-357.

765. Ramon (G.). — La séro-anatoxithérapie diphtérique, son but, ses bases. Premiers résultats d'ensemble. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1938, 3e série, **62**, 1301-1308.

766. Ramon (G.). — La floculation dans les mélanges de bouillon tétanique et de sérum spécifique, et la mesure de la valeur antigène de la toxine et de l'anatoxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 539-541.

767. Ramon (G.). — La méthode de floculation et le dosage des toxines et anatoxines des Bacilles Diphtérique et Tétanique, et de certains germes anaérobies de la gangrène gazeuse *(Perfringens, Vibrion septique, Œdematiens, Hystolytique). Rev. d'Immunol.*, 1940-1941, **6**, 65-85.

768. Ramon (G.) et Richou (R.). — Solution d'antitoxine tétanique et prophylaxie des accidents sériques dans la protection du tétanos. Recherches expérimentales et résultats cliniques. *Rev. d'Immunol.*, 1940-1941, **6**, 209-223.

769. Ramon (G.). — Ferment. Anaferment. Antiferment. *C. R. Acad. Sc.*, 1943, **217**, 562-566.

770. Ramon (G.). — Sur l'association de l'aldéhyde formique et de la chaleur pour assurer la stérilité, la stabilité, etc. des sérums et de diverses substances thérapeutiques d'origine biologique. *Bull. Acad. Méd.*, 1946, 3e série, **130**, 525-529.

771. Ramon (G.). — Les anatoxines, principes et applications. *Scientia*, 1946, 5e série, pp. 99-104.

772. Ramon (G.), Bonnet (H.), Nélis (P.), Richou (R.) et Tieffry (S.). — Sur une méthode d'évaluation du pouvoir antigène de la toxine staphylococcique par la floculation spécifique. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 790-792.

773. Ramon (G.) et Grasset (E.). — La réaction de floculation et le dosage du pouvoir antitoxique du sérum antidiphtérique purifié. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 436-438.

774. Ramon (G.), Nélis (P.) et Bonnet (H.). — Sur la floculation dans les mélanges de toxine staphylococcique et de sérum spécifique; son aspect, ses caractéristiques, sa signification. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 787-790.

775. Ramon (G.) et Richou (R.). — Sur le dosage de la toxine staphylococcique. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 379-382.

776. Ramon (G.) et Richou (R.). — Sur les propriétés antibiotiques des solutions de pénicilline formolées; leur stabilité. Conséquences. *C. R. Acad. Sc.*, 1946, **223**, 368-370.

777. Ramon (G.) et Richou (R.). — De l'existence de principes antidotiques dans les filtrats de « Penicillium notatum ». Conséquences. *Bull. Acad. Méd.*, 1946, **130**, 410-413.

778. Ramon (G.) et Richou (R.). — Recherches sur les propriétés antibiotiques des solutions de Pénicilline formolée et sur leur stabilité. Conséquences pratiques. *Bull. Acad. Méd.*, 1946, **130,** 536-539.

779. Ramsdell (S. G.). — Surface Tensions of sera as affected by the precipitin reaction. *Journ. of Exptl. Med.*, 1928, **46,** 615-617.

780. Ranque (J.). — Contribution à l'étude de l'alexine. Thèse Doct. Méd., Marseille, 1942.

781. Reiner (L.) et Fischer (O.). — Beiträge zum Mechanismus der Immunkörperwirkung. — I Mitteilung : Die Rolle des Ambozeptors und des Komplements bei der Zytolyse. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1929, **61,** 317-335.

782. Reiner (L.) et Kopp (H.). — Entstehung von Liesegang'schen ringen bei der serolog. Präzipitation. *Kolloid Zeitschr.*, 1927, **42,** 335.

783. Reiner (L.) et Kopp (H.). — Zur Frage der Isolierung und Bestimmung des Serumglobins mittels Elektrodialyse. *Kolloid Zeitschr.*, 1928, **46,** 99-107.

784. Reiner (L. Von) et Marton (A.). — Untersuchungen von Formaldehydeiweiss. Ein Fall Divergenz der üblichen Stabilitätsmerkmale bei einer Umwandlung Mechanismus der Gelbildung. *Kolloid Zeitschr.*, 1923, **32,** 273-279.

785. Reiner (L.) et Török (M.). — Ueber Extraktion und Fraktionierung des Wassermann-positiven Serums. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1927, **53,** 532-540.

786. Reiter (H.). — Studien über Antikörperbildung *in vivo* und in Gewebskulturen. — I Mitteilung. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1913, **18,** 5-61.

787. Renaux (E.). — Sur le titrage du sérum antidiphtérique par la méthode de floculation (Ramon). *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89,** 92-94.

788. Renaux (E.). — Sur la floculation de la toxine diphtérique par le sérum antidiphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90,** 964-966.

789. Renaux (E.). — Contribution à l'étude de la réaction de fixation dans les mélanges de toxine et d'antitoxine. *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, **42,** 356-362.

790. Richet (Ch.) et Héricourt (J.). — Sur un microbe pyogène et septique *(Staphylococcus pyosepticus)*, et sur la vaccination contre ses effets. *C. R. Acad. Sc.*, 1888, **107,** 690-692.

791. Roche (A.) et Bracco (J.). — Contribution à l'étude du poids moléculaire des globulines du sérum sanguin. *C. R. Acad. Sc.*, 1934, **199,** 98-99.

— Pression osmotique et poids moléculaire des globulines du sérum, *Bull, Soc. Chim. Biol.*, 1934, **16,** 1479-1497.

792. Roche (A.) et Marquet (F.). — Sur la pression osmotique et le poids moléculaire de l'albumine du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 898-900.

793. Roche (J.) et Derrien (Y.). — Insolubilisation des euglobulines dans l'eau et délipidation du sérum. *C. R. Acad. Sc.*, 1945, **220**, 572.

794. Roche (J.) et Derrien (Y.). — Les protéines du plasma et du sérum. Récentes acquisitions et position actuelle du problème de leur étude; *in* Polonovski (M.). *Exp. Ann. Biol. Med.*, 1945, **5**, 33-70.

795. Roesli (H.). — Zur Spezifizität der Anaphylaxie. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1929, **112**, 151-160.

796. Rolland (R.). — Recherches sur la pathogénie des ictères. Thèse Doct. Méd., Bordeaux, 1947.

797. Rosenau (M. J.) et Anderson (J. F.). — Studies upon hypersusceptibility and immunity. *Hygien. Lab. Bull.*, 1907, n° 36, pp. 11-69.

798. Rosenheim (A. H.). — The action of enzymes on antibodies. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 54-71.

799. Rosenthal (S. R.). — The Conjugaison of Haptens *in vivo*. — I : Phenolphtalein. *Journ. of Immunol.*, 1938, **34**, 251-267.

800. Ross (A. F.) et Stanley (W. M.). — The partial reactivation of formolized tobacco mosaic virus protein. *Journ. Gen. Physiol.*, 1939, **22**, 165-191.

801. Rothen (A.). — Purified diphteria antitoxin in the ultracentrifuge and in the electrophoresis apparatus. *Journ. of Gen. Physiol.*, 1942, **25**, 487-496.

802. Rothen (A.). — Forces involved in the reaction between antigen and antibody molecules. *Science*, 1945, **102**, 446-447.

803. Rothen (A.). — On the mechanism of enzymatic activity. *Journ. of Biol., Chem.*, 1946, **163**, 345-346.

804. Rothen (A.). — Immunological reactions between films of antigens and antibody molecules. *Journ. of Biol. Chem.*, 1947, **168**, 75-97.

805. Rothen (A.), Chow (B. F.), Gree (R. O.) et Dyke (H. B. Van). — Specific properties of films of proteins. *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.*, 1941, **9**, 272-277.

806. Rothen (A.) et Landsteiner (K.). — Adsorption of antibodies by Egg Albumin Films. *Science*, 1939, **90**, 65-66.

807. Rothen (A.) et Landsteiner (K.). — Serological reactions of proteins films and denatured proteins. *Journ. of Exptl. Med.*, 1942, **76**, 437-449.

808. Royer (L.). — Thèse Doct. ès Sciences, Paris, 1929.

809. Ruppel (W. G.). — Lyophile und lyophobe Eiweisskörper als Antigen und Antikörper. *Deutsch. Med. Wochenschr.*, 1923, **49**, 40-43.

810. Ruzicka (L.) et Giacomello (G.). — Polyterpene und Polyterpenoide CX. Uberführung des Gypsogenins in Hederagenin. *Helv. Chim. Acta.*, 1937, **20**, 299-309.

811. Sabin (F. R.). — Cellular reactions to a dye-protein with a concept of the mechanism of antibody formation. *Journ. of Exptl. Med.*, 1939, **70**, 67-82.

812. Sachs (H.) et Klopstock (A.). — Die Serologische Differenzierung von Lezithin und Cholesterin. *Biochem. Zeitschr.*, 1925, **159**, 491-501.

813. Sadikow (W. S.). — Uber einige Bindungsarten im Eiweissmolekül. *Biochem. Zeitschr.*, 1926, **179**, 326-331.

814. Saïas (E.). — Sur quelques propriétés des films mixtes lipoprotéidiques formés à partir de sérum-albumine. *C. R. Acad., Sc.*, 1942, **214**, 393-395.

815. Salkowski (E.). — Uber das Vorkommen von Cholesterinestern in der menschlichen Epidermis und die Reaktionen derselben. *Biochem. Zeitschr.*, 1910, **13**, 361-363.

816. Samuel (F.). — Die Proteine. — II : Spezieller Teil : Einteilung und Eigenschaften der tierischen Protein. In *Oppenheimer Handb. d. Biochem.*, t. 1, 1909. G. Fischer, édit., Jena; pp. 286-346.

817. Sandor (G.). — Le point isoïonique des protéidés. *C. R. Acad. Sc.*, 1935, **200**, 1371-1372.

818. Sandor (G.). — Point isoïonique des protéides du sérum. — I : Méthode de détermination. Résultats obtenus. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 877-907.

819. Sandor (G.). — Purification du sérum antidiphtérique par digestion. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 840-843.

Sandor (G.) et Richou (R.). — Purification du sérum antidiphtérique par digestion. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 461-464.

Sandor (G.). — Purification du sérum antidiphtérique par digestion protéolytique. Coagulation et adsorption sélective des protéides inertes dans les sérums digérés. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 1224-1227.

— Purification des sérums antitoxiques par digestion. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1940, **22**, 129-148.

820. Sandor (G.). — Nature et purification des antitoxines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 157-164.

821. Sandor (G.). — Fractionnement, nature et origine des anticorps. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 164-168.

822. Sandor (G.) et Goldie (H.). — Parallélisme entre certains changements chimiques (acétylation des groupements aminés) du sérum antidiphtérique et les modifications de ses propriétés physico-chimiques (résistance à la dialyse et au chauffage) et biologiques (propriétés antitoxiques et anaphylactogènes). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 295-298.

823. Sandor (G.) et Goldie (H.). — Relations entre les fonctions amines primaires et l'activité antitoxique des protéides du sérum antidiphtérique de Cheval. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 942-944.

824. Sandor (G.) et Goldie (H.). — Influence du cétène sur l'hémolysine anti-Mouton du sérum de Cheval. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 391-395.

825. Sandor (G.) et Goldie (H.). — Nature de l'atténuation du pouvoir anaphylactogène des protéides sériques par le cétène. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 741-742.

826. Sandor (G.) et Pérez (J. J.). — Antitoxines et proantitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 282-284.

827. Schaefer (W.). — Les phénomènes de déplacement de l'anneau et de l'anneau double dans la réaction d'Ascoli. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 480-482.

828. Scheer (J. Van der), Bohnel (E.), Clarke (F. H.) et Wyckoff (R. W. G.). — An electrophoretic examination of several antipneumococcic Rabbit sera. *Journ. of Immunol.*, 1942, **44**, 165-174.

829. Scheer (J. Van der), Wyckoff (R. W. G.) et Clarke (F. H.). — The electrophoretic analysis of tetanal antitoxic Horse serum. *Journ. of Immunol.*, 1941, **40**, 173-177.

830. Schenck (E. G.) et Kunstmann (H. K.). — Uber die Abhängigheit des Baues der Proteine des Blutserums von den Stoffwechselvorgängen im Organismus. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1933, **215**, 87-92.

831. Schiemann (O.). — Weitere Untersuchungen mit dem Kohlenhydrat aus Typ II. Pneumokokken. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionkrankh.*, 1929, **110**, 567-580.

832. Schiemann (O.) et Casper (W.). — Sind die spezifich präzipitablen Substanzen der 3 Pneumokokkentypen Haptene ? *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionkrankh.*, 1928, **108**, 220-257.

833. Schiff (H.). — Ueber Methylasparagine. *J. Liebig's Annal. d. Chem.*, 190,, **310**, 25-44.
— Trennung von Amin- und Säurefunction in Lösungen von Aminsäuren mittels Formaldehyd. *Ibid.*, 1901, **319**, 59-76.
— Trennung von Amin- und Säurefunction mittels Formaldehyde. *Ibid.*, 1902, **325**, 348-354.

834. Schmidt (S.). — Sur le titrage du sérum antidiphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 105-106.

835. Schmidt (S.). — Remarques sur la technique de titrage du sérum antidiphtérique d'après la méthode de Ramon. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90**, 1178-1180.

836. Schmidt (S.). — Le phénomène de floculation des toxines diphtériques et tétaniques vis-à-vis de leurs antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, **42**, 63-104.

837. Schmidt (S.). — Ueber den Einfluss verschiedener Elektrolyten auf die Stabilitäts-und Neutralizationsverhältnisse der Diphterietoxins und des antidiphterischenserums. Dritte Mitteilung : Die Bedeutung der Elektrolyten für die Reaktion zwischen Toxin und Antitoxin. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1930, **67**, 197-239.

838. Schmidt (S.). — Rôle des électrolytes dans la réaction entre toxine et antitoxine diphtériques. Floculation des toxines purifiées en présence de divers sels. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 101-103.

839. Schmidt (S.). — Influence de la concentration en ions hydrogène sur la réaction entre toxine et antitoxine diphtériques. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 624-625.

— Rôle de divers sels dans la réaction entre toxine et antitoxine diphtériques. Action sur le phénomène de Bordet-Danysz. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 106-108.

840. Schmidt (S.). — Influence de quelques amines et amides aliphatiques sur la toxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 536-537.

— Influence de quelques dérivés du Benzène sur la toxine diphtérique. *Ibid.*, 1931, **108**, 537-549.

841. Schmidt (S.). — Adsorption von Maul-und Klauenseuchevirus an Aluminiumhydroxyd unter besonderer Berücksichtigung der immunisierenden Eigenschaften der Virusadsorbate. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1938, **92**, 392-409.

842. Schmidt (C. L.). — Chemistry of the Aminoacids and proteins. 1 vol., 1944, 2e édit., C. C. Thomas édit., Springfield (Ill.).

843. Schmidt (V.). — Weitere Studien über den Faserstoff und die Ursachen seiner Gerinnung. *Arch. f. Anat. u. Physiol.*, 1862, **48**, 428.

844. Schmidt (W. A.). — Untersuchungen über die Erzeugung hochwertiger Muskeleiweiss Antisera für die Fleischdifferenzierung. *Biochem. Zeitschr.*, 1907, **5**, 422-437.

— Studien über Präzipitin und erhitze Eiweisstoffe. *Ibid.*, 1908, **14**, 294.

— Ueber ein Präzipitin, welches es ermöglicht, auch gekochtes (unlösliches) Eiweiss zu differenzieren. *Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therap.*, 1912, **13**, 166.

845. Schmidt (S.) et Jensen (C.). — Propriétés floculantes des sérums antidiphtériques provenant de diverses espèces d'animaux producteurs d'antitoxines. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 566-569.

846. Schockaert (J.). — L'antigène charbonneux dans la réaction d'Ascoli. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1242-1244.

847. Schoenheimer (R.), Ratner (S.), Rittenberg (D.) et Heidelger (M.). — The interaction of antibody protein with

dietary nitrogen in actively immunized animals. *Journ. of Biol. Chem.*, 1942, **144**, 545-554.

848. Scholz (W.). — Ueber die Brauchbarkeit der Flockungsreaktion für die Auswertung antitoxischer Sera (insbesondere des Diphterieantitoxins). *Zentralbl. f. Bakt. u. Paras.*, 1923, **91**, 72.

849. Schulman (J. H.) et Rideal (E.). — Molecular interaction in monolayers. — I : Complexes between large molecules. *Proc. Roy. Soc.* Ser. B, 1937, **122**, 29-45.
— II : Action of hemolytic and agglutinating agents on lipoproteins monolayers. *Ibid.*, 46-57.

850. Schwarz (L.). — Ueber Verbindungen der Eiweisskörper mit Aldehyden. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1900, **31**, 460-478.

851. Scimone (V.) et Torii (D.). — Ueber die antigene Wirkung entäpherter und gekochter sera. *Zeitschr. f. Immunitätsf. u. Exp. Therap.*, 1923-1924, **38**, 264-270.

852. Sedallian (P.), Jourdan (F.) et Clavel (Ch.). — *Revue d'Immunol.*, 1938, **4**, 210-215, 216-229, 304-321, 513-527; 1939, **5**, 34-54, 138-171, 227-240.

853. Seegal (B. C.), Seegal (D.) et Khorazo. — Local organ hypersensitiveness. — V : The fate of antigen and the appearance of antibodies during the development of hypersensitiveness in the Rabbit eye. *Journ. of Immunol.*, 1933, **25**, 207-220.

854. Seelich (F.). — Etudes sur la température critique du sérum : une réaction quantitative et réversible du sérum et de l'éther en fonction de la température. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 794-795.
— Recherches sur la température critique du sérum. Sur la diminution du pouvoir de fixation d'éther par le sérum chauffé et sa réactivation par addition de sérum frais. *Ibid.*, 1932, **110**, 922-923.
— Ueber der Aetherzahl des Serums. *Biochem. Zeitschr.*, 1934, **268**, 34-45.

855. Selye (H.). — Le syndrome général d'adaptation et les maladies de l'adaptation. *Ann. Endocrinol.*, 1946, **7**, 289-401.

856. Seng (W.). — Ueber die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Eiweisskörper im Diphteriaheilserum. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionkrankl.*, 1899, **31**, 513-532.

857. Sevag (M. G.). — *Immuno-catalysis*, 1 vol., 1945. C. C. Thomas, édit., Springfield (Ill.)

858. Sidwick (N. V.). — The Electronic Theory of Valency. 1 vol., 1927, *Oxford University Press*, London.

859. Sikes (A. W.). — On the Globulins of « Albuminous » urine. *Journ. of Physiol.*, 1905, **33**, 101-105.

860. Silber (L. A.) et Demidowa (M. W.). — Ueber Thermostabi-

lität und Natur der Antikörper. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1932, **77**, 504-513.

861. Silber (L. A.), Schafran (A. S.) et Demidowa (M. W.). — Ueber Vakzine. — IV Mitteilung : Ueber den Einfluss der « antidenaturierenden Stoffe » auf die antigenen Eigenschaften der Eiweisskörper. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1933, **79**, 110-116.

862. Smith (F. C.) et Marrack (J. R.). — Diphteria toxin-antitoxin flocules. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1930, **11**, 494-502.

863. Snapper (A.) et Grunbaum (A.). — On the immunity reactions of iodoproteins. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1936, **17**, 361-368.

864. Sobotka (H.) et Friedlander (M.). — The precipitin reaction of antipneumococcus sera. — I : The precipitin index. *Journ. of Exptl. Med.*, 1928, **47**, 57-78.

865. Solomides (J.). — Sur quelques propriétés de la glycérine et du mélange glycérine sérum de Lapin. *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 281-283.

866. Solomides (J.). — Inversion, par la pyridine, de certaines propriétés physico-chimiques des protéines du sérum de Lapin et de Cheval. *C. R. Soc. Biol.*, 1945, **139**, 871-872.

867. Sordelli (A.) et Savino. — *C. R. Soc. Biol.*, 1931.

868. Sordelli (A.) et Serpa (R.). — Titrage du sérum antidiphtérique par la méthode de Ramon. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 1043-1044.

869. Sörensen (S. P. L.). — Enzymstudien. *Biochem. Zeitschr.*, 1908, **7**, 45-101.

870. Sörensen (S. P. L.). — Die Konstitution der löslichen Proteinstoffe als reversibel dissoziable Komponentensystem. *Kolloid Zeitschr.*, 1930, **53**, 102-124.

871. Sprung (M. M.). — A Summary of the reactions of aldehydes with amines. *Chem. Reviews*, 1940, **26**, 297-338.

872. Stanley (W. M.). — Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco-mosaic virus. *Science*, 1935, **81**, 644-645.

873. Stanley (W. M.). — The preparation and properties of Influenza virus vaccines concentrated and purified by differential centrifugation. *Journ. of Exptl. Med.*, 1945, **81**, 193-217; 2 pl. hors-texte.

874. Stockinger (H. E.) et Heidelberger (M.). — A quantitative theory of the precipitin reaction. — IV : The reaction between Mammalian thyroglobuline and antibodies to homologous and heterologous preparations. *Journ. of Exptl. Med.*, 1937, **66**, 251-272.

875. Strauss (E.) et Kaunitz (J.). — Serum albumin as a protective colloid for euglobulin in the formol gel reaction. *Arch. of Biochem.*, 1944, **4**, 159-162.

876. Streng (O.). — Vergleichende Untersuchungen über den Einfluss von Temperatur und Alkali auf die Typhus und Coli-Immunagglutinine auf die Coli-Normalagglutinine. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionkrankh.*, 1909, **62**, 281-362.

877. Stuber (B.). — Zur theorie der Gruber-Widalschen Reaktion. *Munch. Med. Wochenschr.*, 1915, **62**, 1173-1174.

878. Summer (J. B.) et Kirk (J. S.). — Ueber die chemische Natur der Urease. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1932, **205**, 219-230.

879. Suranyi (E.). — Bemerkungen zur Mitteilung von U. Friedemann und E. Herzfeld : « Ueber Immunitätsreaktionen mit lipoidfreien Serum ». *Berliner. Klin. Wochenschr.*, 1912, **49**, 409.

880. Svedberg (T.) et autres. — A discussion on the Protein Molecule. *Proc. Roy. Soc.*, Ser. B, 1939, **127**, 5-40.

881. Svedberg (T.). — Uber die Ergebnisse der Ultrazentrifugierung und Diffusion für die Eiweisschemie. *Kolloid Zeitschr.*, 1938, **85**, 119-128.

882. Svedberg (T.) et Pedersen (K. O.). — The Ultracentrifuge, 1 vol., 1940, Oxford.

883. Svedberg (T.) et Sjögren (B.). — The molecular weights of serum albumin and serum globulin. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1928, **50**, 3318-3332.

884. Svedberg (T.) et Sjögren (B.). — The *p*H stability regions of serum albumin and serum globulin. *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1930, **52**, 2855-2863.

885. Takaki (K.). — Uber Tetanusgift bindende Bestandteile des Gehirns. *Beitr. z. Chem. Phys. u. Path.*, 1908, **11**, 288-303.

886. Takenomata (L.). — Uber den Einfluss von Saponin auf serologische Reaktionen. *Zeitschr. f. Immunitätsf. u. Exp. Therap.*, 1924, **39**, 254-270.

887. Tayeau (F.). — Recherches sur la nature, la stabilité et le rôle biologique des liaisons unissant les lipides et les protéides dans le sérum sanguin. Thèse Doct. ès Sciences, Bordeaux, 1939.

888. Tayeau (F.). — Recherches sur le vieillissement du sérum sanguin. Stabilité des lipides sériques en fonction de la conservation aseptique du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1029-1032.

889. Tayeau (F.). — Sur l'état du cholestérol dans le sérum sanguin. Destruction des cénapses cholestéroprotéidiques par les saponosides. *C. R. Acad. Sc.*, 1941, **212**, 575-576.

890. Tayeau (F.). — Nouvelle méthode permettant l'extraction du cholestérol sanguin en vue de son dosage. *Bull. Trav. Soc. Pharm. de Bordeaux*, 1943, **81**, 63-70.

891. Tayeau (F.). — Destruction des cénapses cholestéroprotéidi-

ques du sérum sanguin par les sels biliaires. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 240-241.

892. Tayeau (F.). — Technique simple et rapide permettant le dosage du cholestérol dans le sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 63-64.

893. Tayeau (F.). — Etude sur les euglobulines du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, 293-295.

894. Tayeau (F.). — Nouvelles recherches sur le vieillissement du sérum sanguin. Stabilité des cénapses cholestéroprotéidiques en fonction de la conservation aseptique du sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 423-424.

895. Tayeau (F.). — Protéides et lipides du sérum sanguin. Thèse Doct. Méd., Bordeaux, 1944.

896. Tayeau (F.). — Tous les saponosides peuvent-ils convenir pour le dosage du cholestérol selon la méthode de Tayeau ? *Ann. Biol. Clin.*, 1947, **5**, 59.

897. Tayeau (F.) et Martin (M.). — Sur la séparation des diverses fractions protéidiques du sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 503-504.

898. Tayeau (F.) et Neuzil (E.). — Sur le rôle joué par les substances lipoïdiques dans les propriétés floculantes du sérum antidiphtérique de Cheval. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 509-510.

899. Tayeau (F.) et Pautrizel (R.). — Sur le rôle joué par les anémies globulaire et plasmatique dans la genèse des anticorps chez le Lapin. *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **224**, 75-76.

901. Tayeau (F.) et Pautrizel (R.). — Action comparée du formol et du monobromacétate de sodium sur la réaction sérum de Lapin-antisérum de Cheval. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, sous presse.

902. Taylor (G. L.). — The result of some quantitative experiments on the serum precipitation reactions. *Journ. of Hyg.*, 1931, **31**, 56-83.

903. Taylor (G. L.). — The dissimilarity of the results of precipitin titration performed with a constant amount of antiserum and with a constant amount of antigen. *Journ. of Hyg.*, 1933, **33**, 12-27.

904. Taylor (G. L.). — The demonstration of the increase of Globulin in diphteria antitoxins by the precipitin reaction. *Journ. of Hyg.*, 1935, **35**, 174-179.

905. Taylor (G. L.), Adair (C. S.) et Adair (M. E.). — The Precipitation Reaction. Optimal proportions, neutrality and maximal precipitation in mixtures of albumin and antiserum. *Journ. of Hyg.*, 1934, **34**, 118-130.

906. Taylor (G. L.) et Adair (M. E.). — The precipitin reaction. Experiments on multiple zones. *Journ. of Hyg.*, 1935, **35**, 169-173.

907. Taylor, Gay et Robertson. — Cité par Marrack [5].
908. Tchistovitch (T. H.). — Etudes sur l'immunisation contre le sérum d'anguilles. *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, **13**, 406-425.
909. Teague (O.) et Field (C. W.). — The electrical charge of toxin and antitoxin. *Journ. of Exptl. Med.*, 1907, **9**, 86-92.
910. Tenbroeck (C.). — The non-antigenic properties of racemized egg-albumin. *Journ. of Biol. Chem.*, 1914, **17**, 369-375.
911. Teorell (T.). — Quantitative aspects of antigen-antibody reactions. — I : a theory and its corollaries. *Journ. of Hyg.*, 1946, **44**, 227-236.
912. Theis (E. R.). — Protein-Formaldehyde reaction. — II : Effect of Temperature and denaturation. *Journ. of Biol. Chem.*, 1945, **157**, 7-14.
913. Thomas (A. W.). — Summary of the isoelectric points of protein. *Journ. Am. Leather Chem. Assoc.*, 1934, **29**, 3-16 et 52.
914. Timmerman (W. A.). — Etude comparative de la réaction de floculation de Ramon effectuée avec une quantité d'antigène constante ou avec une quantité d'antisérum constante. *Ann. Inst. Pasteur.*, 1934, **52**, 146-154.
915. Tiselius (A.). — The moving Boundary method of studying the electrophoresis of proteins. *Nova Acta Regiae Societatis Scientarium Upsaliensis*, Ser. IV, 1930, **7**, 1-107.
916. Tiselius (A.). — Electrophoresis of serum Globulin. — I. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 313-317.
917. Tiselius (A.). — Electrophoresis of serum Globulin. — II : Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 1464-1477.
918. Tiselius (A.). — Electrophoresis of purified antibody preparations. *Journ. of Exptl. Med.*, 1937, **65**, 641-646.
919. Tiselius (A.) et Horsfall (F. L. Jr.). — Mixed molecules of hemocyanins from two different species. *Journ. of Exptl. Med.*, 1939, **69**, 83-101.
920. Tiselius (A.) et Kabat (E. A.). — An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *Journ. of Exptl. Med.*, 1939, **69**, 119-131.
921. Tizzoni (G.) et Cattani (G.). — Uber die Wichtigkeit der Milz bei der experimentellen Immunisierung des Kaninchens gegen den Tetanus. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasitol.*, 1892, **11**, 325-327.
922. Tœnnissen (E.). — Untersuchungen über die Kapsel (Grimmiküle) der pathogenen Bakterien. — II : Die chemische Beschaffenheit der Kapsel und ihr dadurch bedingtes Verhalten gegenüber der Fixierung und Färbung. *Zentralbl. f. Bakt. u. Parasit.*, 1921, **85**, 225-237.
923. Tomcsik (J.). — On carbohydrate-like Specific Substance in

the Colon Aerogenes Group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1926-1927, **24**, 810-812.

924. Topley (W. W. C.). — The role of spleen in the production of antibodies. *Journ. Path. Bact.*, 1930, **33**, 339-351.

925. Topley (W. W. C.), Wilson (J.) et Duncan (J. T.). — The mode of formation of agregates in bacterial agglutination. *Brit. Journ. Exptl. Path.*, 1935, **16**, 116-160; 1 pl. hors-texte.

926. Trensz (F.). — Etudes expérimentales sur le rôle des euglobulines dans le mécanisme de la mélanofloculation de Henry. *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 1935, **13**, 513-565.

927. Troensegaard (N.). — Nachweis von Pyrolkörpern in den Proteinstoffen. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1921, **112**, 86-103.

928. Troensegaard (N.) et Koudahl (B.). — Die Acetylierung der Proteine des Blutes. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1926, **153**, 93-110.

929. Tulasne (R.). — Recherches sur la constitution des anticorps. *Arch. Phys. Biol.*, 1942, **16**, 3*-4*.

930. Tweedy (W. R.) et Torigoe (M.). — Chemical Studies on a parathyroid hormone. *Journ. of Biol. Chem.*, 1932-1933, **99**, 155-164.

931. Tyler (J. A.). — Conversion of Agglutinins and precipitins into « univalent » (non agglutinating or non precipitating) antibody by photodynamic irradiation of Rabbit antisera v. s. pneumococci, sheep red cells and sea urchin sperm. *Journ. of Immunol.*, 1945, **51**, 157-172.

932. Uhlenhuth. — Demonstration eines Dotterantiserums. *Deutsch. Med. Wochenschr.*, 1903, **29**, 39 v.

933. Uhlenhuth. — Zur Lehre von der Unterscheidung verschiedener Eiweissarten mit Hilfe spezifische Sera. *In* Festschrift zum sechzigsten Geburstage von Robert Koch, 1 vol., 1903, Gustav Fischer, édit., Iena; pp. 49-74.

934. Uhlenhuth (P.) et Remy (E.). — Zur Frage der Antikörpern gegen Kohlenhydrate. — V Mitteilung : Versuche mit Aluminiumhydroxyadsorbaten von Glykogen, Reisstärke und Zulkowski-Kartoffelstärke. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1938, **92**, 171-179.

935. Uwazumi (S.). — *Arb. Med. Fakultät. Okayama*, 1934, **4**, 53.

936. Valette (M.). — Action hydrotrope des savons et des sels biliaires pour la lécithine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 1676-1682.

937. Valette (M.) et Cavier (R.). — L'action de quelques savons alcalins, de sels biliaires et de digitonoside sur les mélanges de lécithine et de cholestérol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 1256-1264.

938. Vallée (H.), Carré (H.) et Rinjard (P.). — *Rev. Gén. Méd. Vét.*, 1926, pp. 129-134.

939. Velluz (L.). — Les cryptotoxines. *Journ. Pharm. Chim.*, 1932, 8e série, **15**, 400-409.

940. Velluz (L.). — Sur la stabilité de la liaison pseudoglobulinc-antitoxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 697-699.

941. Velluz (L.). — Données analytiques sur la pseudoglobuline antidiphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 981-984.

942. Velluz (L.). — Action de quelques réactifs de la fonction amine sur les toxines tétanique et diphtérique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 1716-1717.

943. Velluz (L.). — Fonctions aminées et inactivation des toxines microbiennes. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 35-37.

944. Verzar (F.) et Kuthy (A.). — Die Verbindung der gepaarten Gallensaüren mit Fettsaüren u. ihre Bedeutung für die Fettresorption. — III Mitteilung : Oberflächenspannung. *Biochem. Zeitschr.*, 1929, **210**, 281-285.

945. Villedieu (A. M.). — Contribution expérimentale à l'étude physiologique des saponosides. Thèse Doct. Université (Pharm.), Clermont-Ferrand, 1939.

946. Vincent (H.). — Sur les propriétés générales des *cryptotoxines*, en particulier de la cryptotoxine tétanique. *C. R. Acad. Sc.*, 1926, **182**, 1307-1310.

947. Vincent (H.). — Sur les propriétés générales des cryptotoxines. *Biol. Méd.*, 1935, **25**, 299-314.

948. Viscontini (M.). — Etude du mécanisme de l'agglutination microbienne. *C. R. Acad. Sc.*, 1944, **219**, 222-224.

949. Vlès (F.) et Coulon (A. de). — Revue des notions actuelles sur un problème de physico-chimie pathologique : les propriétés des points isoélectriques et du terrain physico-chimique de l'organisme normal ou pathologique; leur application à l'étude des tumeurs. *Arch. Phys. Biol.*, 1928-1929, **7**, fasc. suppl. 5, pp. 1-64.

950. Vries (A. de). — On the connection between the formolgel reaction and the blood proteins. *Acta Med. Scand.*, 1939, **99**, 425.

951. Wadsworth (A.) et Brown (R.). — Chemical and immunological studies of the pneumococcus. — I : A specific antigene carbohydrate of type I pneumococcus. *Journ. of Immunol.*, 1931, **21**, 245.

952. Wadsworth (A.) et Pangborn (M. C.). — The reaction of formaldehyde with aminoacids. *Journ. of Biol. Chem.*, 1936, **116**, 425-436.

953. Wadsworth (A.), Quigley (J. J.) et Sickles (G. R.). — Preparation of diphteria toxoid. The action of formaldehyde : precipitation by calcium. *Journ. of Inf. Diseases*, 1937, **61**, 237-250.

954. Wadsworth (A.), Wheeler (M. W.) et Mendez (L.). — The attenuation and Toxin production of the Diphteria Bacillus. — IV : Ultrafiltration of the toxin produced in peptone-dialysate. *Journ. of Inf. Diseases*, 1938, **62**, 129-130.

955. Wahl (R.). — Action des substances non spécifiques sur le taux des anticorps (agglutinines). *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **61**, 415-425.

956. Wangermez (C.), Jeanneney (G.), Ladignac et Labail. — La radio-activité des tissus néoplasiques; valeur des anneaux de Liesegang comme système détecteur. *Arch. Electr. Méd.*, 1938, **46**, 230.

957. Wassermann (A.) et Citron (J.). — Uber die Bildungsstätten der Typhus immunkörper. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionkr.*, 1905, **58**, 331-348.

958. Wassermann (A. V.) et Takati (T.). — Ueber Tetanusantitoxische Eigenschaften des normalen Zentralnervensystems. *Berlin. Klin. Wochenschr.*, 1898, **35**, 5-6.

959. Weil (A. J.) et Besser (F.). — Die Antigeneneigenschaften von Cholesterin, Cholesterinderivaten und synthetischen Lezithin. *Klin. Wochenschr.*, 1931, **10**, 1941-1944.

960. Weil (A. J.), Ritzenthaler (B.) et Merckens (H.). — Untersuchungen über lipoide Haptene. — V Mitteilung : Zur Kenntniss der Bedingungen der Adsorption und Elution des Antigens aus alkoholischen Organextrakten. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1938, **68**, 316.

961. Weinberg (M.) et Parvu (M.). — Réaction de Bordet-Gengou dans les Helminthiases. *C. R. Soc. Biol.*, 1908, **45**, 298.

962. Weir (J. M.). — Technic for demonstrating antibodies against tuberculin in experimental animals with sensitized collodion pellets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, **46**, 47-51.

963. Wellisch (J.). — Uber synthetische Alkaloide aus Tyrosin, Tryptophan und Histidin. *Biochem. Zeitschr.*, 1913, **49**, 173-194.

964. Welsh (D. A.) et Chapman (H. G.). — On the Weight of precipitum obtainable in precipitin interactions with small weights of homologous proteins. *Proc. Roy. Soc.*, Ser. B, 1908, **80**, 161-164.

965. Went (St.) et Sarkady (L.). — Serologische Wirkung und Eiweisszusammensetzung einiger Immunserumfiltrate. *Zeitschr., f. Immunitätsf.*, 1937, **91**, 157-164.

966. Weyl (T.). — Beiträge zur Kenntnis tierischer und pflanzlicher Eiweisskörper. *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1877, **1**, 72.

967. White (C. P.). — Cholesterol-fatty acid combinations. *Journ. of Physiol.*, 1909, **38**, vi.

968. White (A.) et Dougherty (T. F.). — Influence of Pituitary Adrenotrophic Hormone on Lymphoid Tissue Structure in

relation to serum proteins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1944, **56**, 26-37.

— The Pituitary Adrenotrophic Hormone control of the rate of release of serum globulins from lymphoid tissue. *Endocrinol.*, 1945, **36**, 207-217.

969. White (W.) et Gerlough (T. D.). — Some factors influencing the rate of thermal destruction of the tetanus antitoxin of antitetanic Horse plasma at 60° to 66° C. *Journ. of Immunol.*, 1934, **27**, 367-377.

970. Wiener (A. S.) et Herman (M.). — The second stage of agglutinative reaction. *Journ. of Immunol.*, 1939, **36**, 255-259.

971. Willheim (R.). — Ueber eine, durch neutrale Salze bewirkte, mit neuerlicher Koagulationsfähigkeit einhergehende Lösung von Eiweisskoagulaten. *Kolloid Zeitschr.*, 1929, **48**, 217-231.

972. Willstatter (R.) et Rohdewald (M.). — Uber den Zustand des Glykogens in der Leber im Muskel und in Leukocyten (Zur Kenntnis der Proteinbindung physiologisch wichtiger Stoffe). *Hoppe Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 1934, **225**, 103-124.

973. Wise (C. R.) et Gutman (A. B.). — Formolgel reaction; convenient preleminary test for hyperglobulinemia. *Am. Journ. Med. Sc.*, 1937, **194**, 263-270.

974. Witebsky (E.). — Ueber die Antigenfunktion der alkohollöslichen Bestandteile menschlicher Blutkörperchen verschiedener Gruppen. — I : *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1926, **48**, 369-396; II : *Ibid.*, 1927, **49**, 1-17; III : *Ibid.*, 1927, **49**, 517-531.

975. Witebski (E.) et Okabe (K.). — Ueber den Nachweiss von Gruppenmerkmalen in den Organen des Menschen. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1927, **52**, 359-369.

976. Witebsky (E.) et Okabe (K.). — Isoagglutinine und gruppenspezifische Lipoide. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1927-1928, **54**, 131-137.

977. Witebsky (E.) et Okabe (K.). — Ueber die Erzeugung gruppenspezifischer Menschenblutantikörper bei Meerschweinchen. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1927-1928, **54**, 181-188.

978. Wladimiroff. — Ueber Agglutination bakterienfreier Filtrate von Rotzkulturen. *St.-Petersb. Med. Wochenschr.*, 1898.

979. Wollmann (E.). — La nature chimique des anticorps. 1 vol., 1943. Vigot, édit., Paris.

980. Wollmann (E.) et Bardach (M.). — Recherches sur la présence d'antigène dans les antisérums par l'épreuve du choc anaphylactique. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1425-1427.

981. Wollmann (E.), Gonzalès (Ph.) et Ducrest (P.). — Recherches sérologiques sur les milieux transparents de l'œil,

Propriétés spécifiques du cristallin. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 668-670.

982. Wormall (A.). — The immunological specificity of chemically altered proteins. Halogened and nitrated proteins. *Journ. of Exptl. Med.*, 1930, **51**, 295-317.

983. Wrinch (D. M.). — The pattern of proteins. *Nature*, 1936, **137**, 411-412.

984. Wright (G.). — Studies on the denaturation of antibodies. — I : The action of urea on Diphteria antitoxin. *Journ. of Exptl. Med.*, 1944, **79**, 455-461.

985. Wright (G.). — Studies on the denaturation of antibodies. — II : The effect of protein concentration on the rate of denaturation of Diphteria antitoxin by urea. *Journ. of Exptl. Med.*, 1945, **81**, 647.

986. Wu (H.), Cheng (L. H.) et Li (C. P.). — Composition of antigen-precipitin precipitate. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1927-1928, **25**, 853-855.

987. Wu (H.), Sam (P. P. T.) et Li (C. P.). — Composition of antigen-precipitin precipitate. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1928-1929, **26**, 737-738.

988. Young (E. G.). — On the optical rotatory power of crystalline ovalbumin and serum albumin. *Proc. Roy. Soc.*, Ser. B, 1922, **93**, 15-35.

989. Youmans (G. F.) et Colwell (C. A.). — Constant antiserum optimal ratios obtained with rat precipitin. *Journ. of Inf. Diseases*, 1940, **67**, 48-52.

990. Zeiger (K.). — Zur Frage nach der Wirkungsweise des Formaldehyds bei der histologischen Fixation. *Zeitschr. f. Wissensch. Mikr.*, 1930-1931, **97**, 273-293.

991. Zinsser (H.). — On antigenic properties of Horse serum and egg albumin after heat coagulation. *Journ. of Immunol.*, 1924, **9**, 227-230.

992. Zinsser (H.). — Note on the quantitative relations of antigen and antibody in agglutination and precipitation reactions. *Journ. of Immunol.*, 1930, **18**, 483-486.

993. Zinsser (H.) et Castanada (M. R.). — Studies on typhus fever. — V : Active immunization against Typhus fever with formalinized virus. *Journ. of. Exptl. Med.*, 1931, **53**, 325-331.

994. Zinsser (H.) et Parker (J. T.). — Observations on a substance in immune Horse serum which interferes with alexin fixation. *Journ. of Immunol.*, 1923, **8**, 151-161.

995. Zozoya (J.), Boyer (J.) et Clark (J.). — The Standardization of antipneumococcic serum type I and II. *Journ. of Exptl. Med.*, 1930, **52**, 471-476.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIÈRE PARTIE

Les antigènes et les anticorps.
Notions fondamentales. Acquisitions récentes.

LES ANTIGÈNES ET LES ANTICORPS 7

CHAPITRE PREMIER. — LES ANTIGÈNES 10

I. — Conditions générales du pouvoir antigène 10
A. — Pouvoir antigène et dimensions moléculaires 10
B. — Spécificité zoologique et tissulaire de l'antigène .. 11
C. — Nature protéidique des antigènes 12

II. — LES ANTIGÈNES PROTÉIDIQUES 14
A. — Modifications de certaines fonctions chimiques de la molécule protéidique 16
B. — Couplage de nouveaux chaînons aux protéides 17

III. — Notion de haptène 23
A. — Haptènes polyosidiques 24
B. — Haptènes lipoïdiques 25

IV. — Les antigènes non protéidiques 26
A. — Les antigènes polyosidiques 27
B. — Les antigènes de BOIVIN 27
C. — Les antigènes de structure chimique simple 27

Conclusions 29

CHAPITRE II. — LES ANTICORPS 31

I. — Constitution chimique des anticorps 31
A. — Nature protéidique des anticorps 31
B. — Isolement des anticorps 33
C. — Données physicochimiques sur les anticorps 35

II. — LIEU DE FORMATION DES ANTICORPS 41

III. — MÉCANISME DE FORMATION DES ANTICORPS 44

Conclusions 54

DEUXIÈME PARTIE

La réaction de précipitation spécifique. Etude théorique.

Pages

CHAPITRE PREMIER. — RAPPEL HISTORIQUE. — GÉNÉRALITÉS .. 57

CHAPITRE II. — PREMIÈRE PHASE : COMBINAISON ANTIGÈNE-ANTICORPS 64

I. — Forces unissant l'antigène à l'anticorps 65
A. — Forces intermoléculaires fortes 65
B. — Forces intermoléculaires faibles 67

II. — Etude de la première phase 72

CHAPITRE III. — DEUXIÈME PHASE : PRÉCIPITATION DU COMPLEXE 78

I. — Etude du précipité 78
A. — Le phénomène de zone 78
B. — Composition du précipité 83
C. — Solubilité du précipité 86
D. — Réversibilité de la réaction 88
E. — Action de différents facteurs sur la composition du précipité 90
1° Action des électrolytes 90
2° Action du *p*H 91
3° Action de la température 91
4° Action des protéides sériques non spécifiques.. 92
5° Action de différentes substances non spécifiques. 93

II. — Vitesse de floculation 93
A. — Méthodes de mesure 93
1° Primofloculation de RAMON 93
2° Proportions optima de DEAN et WEBB 95
3° Comparaison des deux méthodes 96
B. — Action de différents facteurs sur la vitesse de floculation 100
1° Action de la température 101
2° Influence de l'agitation 101
C. — Systèmes non homogènes 101

CHAPITRE IV. — MÉCANISME DES RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION .. 105

I. — Théorie d'EHRLICH 106

II. — Théorie d'ARRHENIUS 107

III. — Théorie de BORDET 108

Pages

IV. — Théories de multivalence mutuelle 112
A. - Théorie de Marrack 112
B. - Théorie d'Heidelberger 116
C. — Théorie de Pauling 118
D. — Théorie de Dervichian et Grabar 120
V. — Critique des théories de multivalence mutuelle 122

TROISIÈME PARTIE

Recherches expérimentales.

Plan 133

Chapitre premier. — Localisation de la fraction précipitante du sérum antidiphtérique de Cheval 135

I. — Généralités : Les constituants protéidiques du sérum sanguin 135

II. — Travaux personnels 138
A. — Techniques utilisées 139
1° Titration du sérum antidiphtérique et du pouvoir floculant des différentes fractions sériques. 139
2° Obtention des diverses fractions globuliniques .. 140
B. — Recherches expérimentales 146
1° Pouvoir floculant des globulines totales 146
2° Pouvoir floculant des fractions globuliniques isolées par dialyse 147
3° Pouvoir floculant des CO_2-globulines 149
4° Pouvoir floculant des fractions globuliniques obtenues par la méthode au sulfate d'ammonium 150
5° Pouvoir agglutinant des différentes fractions globuliniques 152
C. — Interprétation du pouvoir floculant des diverses fractions globuliniques 154

Conclusions du Chapitre premier 157

Chapitre II. — Rôle joué par les lipides dans les réactions de précipitation antigène-anticorps 159

I. — Généralités 159
A. — Les lipides du sérum sanguin 159
B. — Importance des lipides en immunologie 161
C. — Les lipides dans la réaction de précipitation spécifique 163

Pages

II. — Travaux personnels 168

A. — Rôle du cholestérol dans les réactions de précipitation spécifique 168
1° Techniques utilisées 172
2° Expériences préliminaires 175
3° Système toxine diphtérique - immunsérum de Cheval 177
4° Système sérum de Cheval-antisérum de Lapin.. 179
Conclusions 182

B. — Techniques de délipidation totale appliquées à la réaction de précipitation spécifique 183
1° Délipidation par la technique de Hardy et Gardiner 184
2° Délipidation par la méthode de Delsal 188
3° Délipidation par la technique de Piettre 191

Conclusions du Chapitre II 194

Chapitre III. — Action comparée du formol sur l'antigène et sur l'anticorps dans la réaction sérum de Cheval-antisérum de Lapin 196

I. — Généralités 196

A. — Action du formol sur les aminoacides et sur les protéines 196

B. — Action du formol sur les réactifs immunologiques. 201
1° Action sur les antigènes 201
2° Action sur les anticorps 206

II. — Travaux personnels 210
Action comparée du formol sur l'antigène et sur l'anticorps d'un même système précipitant 210

A. — Etude de la zone d'équivalence 211

B. — Influence des proportions variables d'antigène et d'anticorps 216

Conclusions du Chapitre III 224

Résumé et conclusions générales 225

Bibliographie 229

Bordeaux. — Imp. E. Drouillard, 3, place de la Victoire.